



VÚVeL Academy - od výzkumu k praxi v chovech
hospodářských zvířat, cyklus seminářů

SBORNÍK ZE SEMINÁŘE
10. 10. 2024
(VÚVeL)

ASISTOVANÁ REPRODUKCE V CHOVECH
DOJENÉHO SKOTU

Česká technologická platforma pro zemědělství ve spolupráci
s Výzkumným ústavem veterinárního lékařství, v. v. i.

si Vás dovoluji pozvat na seminář VÚVeL ACADEMY

ASISTOVANÁ REPRODUKCE V CHOVECH DOJENÉHO SKOTU

Akce se uskuteční

10. 10. 2024, 10:00–15:00

Místo konání: Výzkumný ústav veterinárního lékařství, v. v. i., Hudcova 296/70, Brno 621 00

Program:

- Využití asistované reprodukce v chovech skotu – doc. MVDr. Svatopluk Čech, Ph.D. (VÚVeL, VETUNI)
- Nové trendy v přípravě embryí skotu *in vitro* – doc. MVDr. Martin Anger, CSc. (VÚVeL)
- Webové aplikace ČMSCH, a.s. pro práci s GePH – Ing. David Lipovský (ČMSCH, a.s.)
- Využití genomického testování v chovech dojeného skotu – Ing. Roman Hruda (CRV Czech Republic, spol. s r.o.)
- Nové poznatky v procesu MOET a IVP – doc. MVDr. Svatopluk Čech, Ph.D. (VÚVeL, VETUNI)
- Hodnocení semene u skotu – RNDr. Věra Kopecká, Ph.D. (VÚVeL)

Registrace: on-line na odkazu www.vri.cz/prihlaseni

Kontaktní osoba: doc. MVDr. Soňa Šlosárková, Ph.D.; tel.: +420 773 756 631

Informace pro účastníky:

- Seminář přináší poznatky vzniklé řešením Projektů TN02000017/018 *Optimalizace metody transvaginální sonografické aspirace oocytů a intrafolikulárního transferu oocytů u skotu*, TN02000017/03 *Optimalizace in vitro kultivace a mikromanipulace oocytů a embryí skotu* a TN02000017/017 *Nové metody hodnocení kvality spermií plemenných býků* spolufinancovaných se státní podporou Technologické agentury ČR v rámci Programu Národního centra biotechnologií ve veterinární medicíně NaCeBiVet.
- Kapacita sálu je omezená, registrace nutná.

ASISTOVANÁ REPRODUKCE

Řízená reprodukce
Biotechnika reprodukce
Asistovaná reprodukce
Reprodukční biotechnologie

Využití asistované reprodukce v chovech skotu

Doc. MUDr. Svatopluk Čech, Ph.D.
Výzkumný ústav veterinárního lékařství Brno
Veterinární univerzita Brno

ASISTOVANÁ REPRODUKCE

Definice:

Manipulace s reprodukcí u zdravých zvířat s cílem zlepšit ekonomický profit chovatele.

ASISTOVANÁ REPRODUKCE

- * Umělá inseminace, kryokonzervace semene
- * Sexace spermií
- * Indukce porodu
- * Aktivní vedení puerperia
- * Medikamentózní kontrola průběhu říje, ovulace a gravidity
- * Stimulace a indukce říje
- * Indukce ovulace
- * Synchronizace říje
- * Potlačování pohlavní aktivity
- * Podpora funkce žlutého tělíska a rané gravidity
- * Transfer embryí
- * MOET (multiple ovulation and embryo transfer)
- * IVP (in vitro embryo production)
- * Související techniky

Klonování
Produkce transgenních zvířat
Intracytoplasmic sperm injection (ICSI)
gamete intrafollicular transfer (GITF)
Intrauterinální transfer oocytů

ASISTOVANÁ REPRODUKCE

- ✘ Metody používané pro zlepšení reprodukční výkonnosti ošetřovaných zvířat
- ✘ Metody používané pro zvýšení genetické úrovně populace

ASISTOVANÁ REPRODUKCE

Metody používané pro zvýšení genetické úrovně populace

PRAKTICKÉ VYUŽITÍ REPRODUKČNÍ BIOTECHNOLOGIE

- Optimalizace genetického základu zvířat (produkce)
- Výroba živočišných produktů specifických vlastností (technologie výroby potravin)
- Výroba specifických proteinů (transgenní zvířata)
- Biomedicínální účely (xenotransplantace)
- Zachování genetické diversity (embryonální a somatické buňky)

UMĚLÁ INSEMINACE

1. Zdraví

zabránění přenosu infekčních onemocnění

2. Ekonomika

počet chovaných samců

3. Chovatelské důvody

využití geneticky nejhodnotnějších jedinců

Odběr ejakulátu



PRODUKCE INSEMINAČNÍCH DÁVEK

Druh	Celkový počet spermíí	Spermíí v jedné dávce	Počet dávek
Býk	4 Mld.	40 mil.	100
Hřebec	9 Mld.	300 mil.	30
Kanec	37 Mld.	2 Mld.	20



Automatický označovač pejet



Automatické plnění a uzavírání zařízení pro 0,25 and 0,5ml pejety

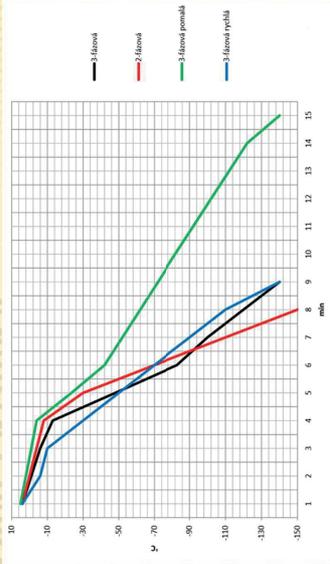


Pejety

TECHNOLOGIE MRAŽENÍ

- ✗ zmrazovací protokol
- ✗ klasické zmrazování v parách kapaliného dusíku
- ✗ řízené mrazení v mrazících přístrojích s kontrolovaným poklesem teploty
 - + zmrazovací křivka- 2-fázová, 3- fázová
- ✗ aplikací dávek na blok suchého ledu – pelety (-79°C)
- ✗ pomalé x rychlé zmrazování
 - (současné protokoly používají poklesy teploty 10 -100 °C/min)

ZMRAZOVACÍ KŘIVKA

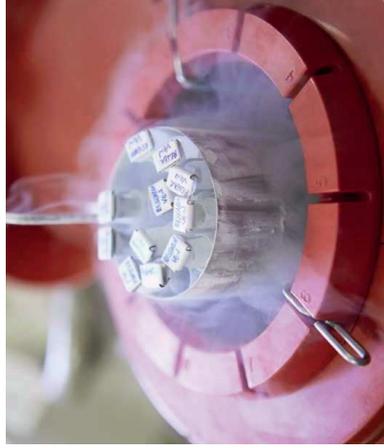
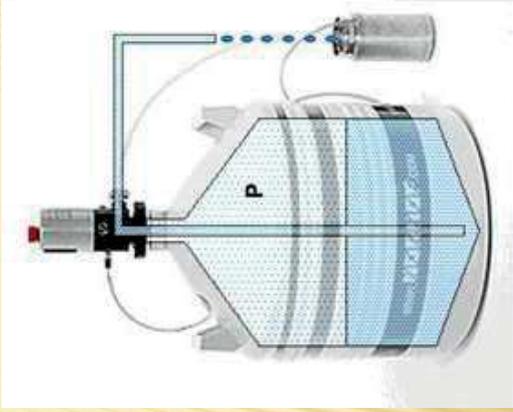


- kritické momenty **+15 °C až +5°C** změny membrány, **-5°C až -15°C** tvorba krystalů

5°C až -10°C rychlost 5°C/min;
 -10°C až -110°C rychlost 40°C/min;
 -110°C až -140°C rychlost 20°C/min,
 pak vložení do tekutého dusíku

zdroj: USDA - United States Department of Agriculture

SKLADOVÁNÍ DEWAROVA NÁDOBA





PŘÍPRAVA INSEMINAČNÍ DÁVKY PŘED UMĚLOU INSEMINACÍ

Rozmrazení

- stejně důležité pro přežití spermií jako mražení
- nejčastěji vodní lázeň 38-40 °C
- opatrně na přehřátí inseminační dávky při rozmrazování



rozmrazovací nádoba



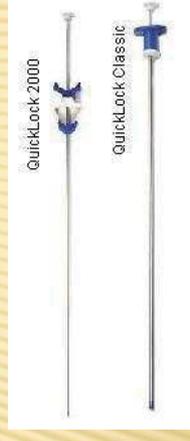
vodní lázeň

TRANSPORT ZMRAŽENÝCH INSEMINAČNÍCH DÁVEK



jednorázový transportní obal Cryodrum

- inseminační nástroje musí být zahřáty na 38 °C
- příprava inseminační dávky těsně před inseminací k zabránění opětovnému zchlazení semene nebo metabolickému vyčerpání spermií
- po rozmražení – udržení dávky při 38 °C až do inseminace (max. do 30 min ??)



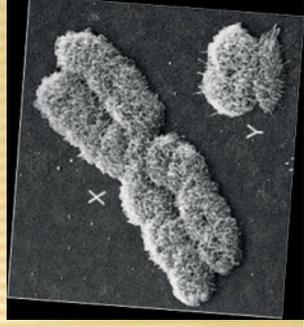
Inseminační nástroje pro inseminaci skotu



Ohríváč inseminačních nástrojů

SEXACE SPERMIIÍ

- ✗ na základě rozdílného množství DNA pohlavních chromozomů (u skotu X o 4% více než Y)



- ✗ fluorescence (průtokový cytometr)

SEXACE SPERMIIÍ

- ✗ U skotu mají spermie nesoucí X chromozom o 3 - 5 % DNA více než spermie nesoucí Y chromozom.
- ✗ Díky fluorescenčnímu barvivu, které se váže na DNA, jsou spermie X po ozáření laserem jasnější.
- ✗ Spermiiím se přidělí kladný náboj pro samičí pohlaví a záporný pro samčí.
- ✗ Podle náboje jsou spermie na konci kapijáry rozděleny podle pohlaví.
- ✗ Chybovost metody do 10 %

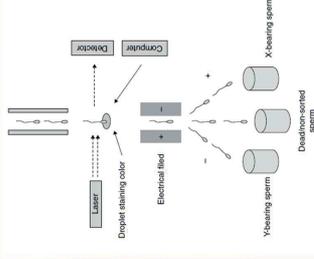
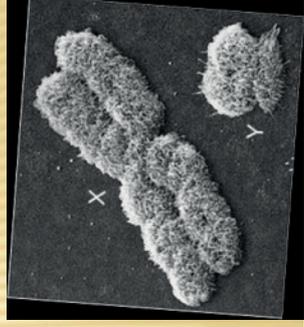


Figure 21. Schematic of flow cytometry for sorting X- and Y-bearing sperm.

SEXACE SPERMIIÍ

- ✗ na základě rozdílného množství DNA pohlavních chromozomů (u skotu X o 4% více než Y)



- ✗ fluorescence (průtokový cytometr)

Vliv procesu sexace na vlastnosti inseminační dávky

Mechanický stress – průchod spermii přes sorter

Rychlá průtoková cytometrie
90 km/h při průchodu spermii tryskou

- ✗ Odpad až 60%
(buňky nepřijaly dostatek barviva, spermie nejsou správně přečteny)
Časová náročnost procedury

Nižší počet spermii v ID
Nižší oplozovací schopnost spermii
Nižší zabřezávání

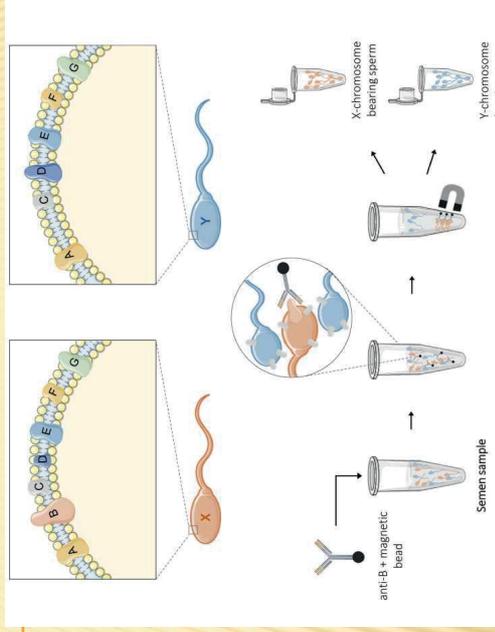
POSTUP INSEMINACE

- ✗ Přednostně pro jalovíce
60% dospělé váhy, střední BCS, inseminace za 8 – 12 h po začátku říje

Manipulace s ID:

- ✗ Velmi opatrná, teplé prostředí bez průvanu
- ✗ Vodní lázeň 32 – 35 °C, 45 sekund
- ✗ Všechny instrumenty (pinzeta, inseminační pipeta) nejdříve ohřát
- ✗ Inseminovat do 15 minut po rozmrazení

IMUNOLOGICKÉ METODY SEXACE SPERMIÍ



Quelhas et al., 2020

FIGURE 1 Method proposed for the separation of X- and Y-chromosome-bearing sperm based on differences on plasma membrane protein content. For example, plasma membrane of X-sperm contains protein A, B, C, D, E, F and G, but in Y-sperm plasma membrane, protein B was absent. The development of an anti-B antibody, against protein B exclusively expressed in X-sperm, will allow the recognition of X-sperm only. This anti-B antibody can be coupled to magnetic beads to immunocapture the desired cell population (X-sperm) allowing its separation from Y-sperm, with less damage and potentially less sperm loss than the currently available methods.

TRANSFER EMBRYÍ

- ✗ Odběr embrya (embryí) z dělohy dárce
- ✗ Přenos embrya do dělohy příjemce

TRANSFER EMBRYÍ

- ✗ 1891 Cu
- ✗ 1934 Ov, Cap
- ✗ 1949 Bo
- ✗ 1951 Su
- ✗ 1974 Eq
- ✗ 1978 Ho

TRANSFER EMBRYÍ

- ✗ 70 léta: rozvoj ET u skotu (synchronizace, superovulace)
- ✗ nechirurgický ET
- ✗ 80 léta: kryokonzervace embryí, mikromanipulace
- ✗ 90 léta: počátek in vitro produkce embryí (IVP) vitifikace
- ✗ 00 léta: zpracování IVP, kryokonzervace
- ✗ 10 léta: genomická testace zvířat

TRANSFER EMBRYÍ - SKOT

- ✘ překonání přirozeného reprodukčního limitu geneticky nejhodnotnějších zvířat
- ✘ zkrácení generačního intervalu, genomická selekce
- ✘ usnadnění pohybu genetického materiálu
- ✘ zachování genofondu
- ✘ výzkum

MOET

Multiple ovulation and embryo transfer

Top 100 TPI Bulls AUGUST 2024

(Semen Status is ACTIVE or LIMITED with a minimum of 80% traditional US reliability OR 85% Genomic reliability for production and type)

Rank	Name	% RHA	NAAB	PROFAT	MILK	FE	%R	SCS	HEALTH	PL	%R	LIV	FL	PTAT	%R	UDC	ELC	BWC	TPI		
1	GENSOURCE CAPTAIN-ET	TR	TE	994	55H004119	89154	2462	427	99	2.97	5.6	93	0.0	0.8	0.98	99	1.57	0.00	-2.65	3331G	
2	PLAIN-KNOLL RENEGAD TROOPER	TR	TP	994	14H015179	75124	1198	304	98	2.91	3.9	89	-0.2	1.7	1.85	93	1.36	1.18	1.09	3201G	
3	WESTCOAST LAMBEAU-ET	TR	TP	994	20H011862	75130	1655	326	98	2.95	4.1	89	-1.0	4	1.67	97	1.67	0.66	1.16	3188G	
4	S-SI EISAKU PAVLOAD-ET	TR	TP	994	7H018346	84114	2010	347	98	3.02	4.8	89	1.0	-0.2	1.75	95	1.64	0.96	-0.30	3163G	
5	KINGS-RANSOM DUFFY-ET	TR	TE	994	29H019773	73110	1715	318	95	2.99	6.7	86	3.6	0.6	1.26	89	1.29	1.42	-0.77	3153G	
6	MR T-SPRUCE FRAZZ LIONEL-ET	TR	TP	994	7H014454	99151	3315	426	99	2.84	2.4	99	-2.6	-1.3	0.63	99	0.85	-0.86	-0.62	3141G	
7	SIEMERS RENEGAD PARFECT-ET	TR	TP	994	20H011586	69115	1465	271	99	2.62	5.2	95	0.0	1.5	1.21	98	2.00	-0.54	1.06	3121G	
8	DELICIOUS HAOON TAMPA-ET	TR	TP	994	55H002797	82	77	2532	293	99	2.91	6.0	96	2.1	3.8	0.68	99	1.17	0.90	-1.07	3110G
9	DELICIOUS LIONEL MILKY-ET	TR	TP	994	7H016233	82132	1963	391	93	2.96	4.1	86	1.5	-0.6	0.54	91	1.21	0.01	-1.47	3108G	
10	PINE-TREE LIONEL MILKY-ET	TR	TP	994	77H012123	70112	1632	289	96	2.76	4.1	85	1.6	0.4	1.49	90	1.64	0.37	-0.29	3102G	
11	PROGENESIS MONTEVERDI-ET	TR	TP	994	77H012123	70112	1632	289	96	2.76	4.1	85	1.6	0.4	1.49	90	1.64	0.37	-0.29	3102G	
12	PLAIN-KNOLL CRUSHER-ET	TR	TP	994	7H014685	82119	2120	333	98	2.94	3.1	89	-1.1	1.0	1.07	93	0.84	0.68	0.50	3093G	
13	S-SI RENEGADE RUPPERT-ET	TR	TP	994	7H014685	82119	2120	333	98	2.94	3.1	89	-1.1	1.0	1.07	93	0.84	0.68	0.50	3093G	
14	WINSTAR LIONEL PERPETUAL-ET	TR	TP	994	7H015245	80140	1966	354	93	2.59	3.9	86	-1.0	-1.3	0.67	92	0.39	0.14	0.28	3083G	
15	WINSTAR LIONEL PERPETUAL-ET	TR	TP	994	7H015245	80140	1966	354	93	2.59	3.9	86	-1.0	-1.3	0.67	92	0.39	0.14	0.28	3083G	
16	FARNEAR UPSIDE-ET	TR	TE	994	55H004034	80112	2488	343	99	2.82	4.8	92	2.4	0.8	0.44	99	0.95	0.30	-1.69	3081G	
17	LEANINGHOUSE TACS-ET	TR	TP	994	7H015112	80	84	1871	236	99	2.78	4.4	91	-0.4	2.1	1.62	98	1.26	1.40	1.97	3073G
18	DENOV0 16719 AUGUST-ET	TR	TP	994	29H019654	64106	1396	293	91	2.81	5.0	83	1.6	1.5	1.20	85	1.70	0.41	-0.19	3072G	
19	DENOV0 16333 ENUY-ET	TR	TE	TC	29H019510	77140	1871	348	96	2.90	3.4	88	2.7	-1.8	1.08	89	0.70	1.04	0.30	3069G	
20	ST GEN DUBAI ONDUTY-ET	TE	TC	994	55H004250	54	76	745	229	96	2.81	5.1	85	1.3	3.7	2.01	90	2.78	-0.52	-0.27	3056G
21	ST GEN PHAZE RAPID-ET	TE	TC	100-NA	55H003691	75	89	2632	290	99	3.03	4.1	86	0.4	0.2	2.28	89	1.90	0.03	0.64	3053G
22	DELICIOUS CHARL HOLDON-ET	TR	CD	994	55H003823	72	101	2905	338	89	2.59	5.7	82	0.9	1.5	0.49	85	0.85	-1.15	-1.46	3047G
23	PEAK ALTAQUAF-ET	TR	TP	994	11H016225	102	94	3240	339	89	2.79	4.4	89	0.5	-0.9	0.67	94	0.51	0.13	-1.27	3047G
24	CCD BILLY SIMBA-ET	TR	TP	994	14H015400	61137	1023	341	96	2.88	3.9	86	1.0	0.4	0.66	94	0.73	0.62	-0.75	3043G	
25	FU-HIGHER HUCK-ET	TR	TP	994	11H016396	68100	1739	282	94	2.69	6.1	84	0.8	0.5	1.50	87	1.80	-0.57	-0.35	3041G	
26	PEAK ALTAQUAF-ET	TR	TP	994	11H016396	68100	1739	282	94	2.69	6.1	84	0.8	0.5	1.50	87	1.80	-0.57	-0.35	3041G	
27	PINE-TREE ZANBERK-ET	TR	TP	994	97H042425	59104	1003	259	97	2.86	5.9	88	3.7	1.8	1.10	89	0.74	-1.01	0.86	3036G	
28	CLAYNOCK ZANBERK-ET	TR	TP	100-NA	77H011688	86122	1715	320	99	2.97	0.8	93	-3.2	-2.3	2.37	99	2.56	-0.62	0.85	3035G	
29	HEIDFARM ALTAGGAWAY-ET	TR	TP	994	11H015432	74106	1574	322	96	2.64	3.5	88	0.4	-0.6	0.89	89	1.70	0.84	-1.74	3035G	
30	ST GEN TAMPA EPPY-ET	TE	TC	994	55H004221	74105	2424	310	97	2.85	5.2	88	1.7	2.0	0.62	91	0.28	0.17	-0.14	3031G	
31	PEAK ALTAQUAF-ET	TR	TP	994	11H016988	77	92	3028	298	99	2.78	7.4	93	3.3	2.7	-0.06	95	1.07	-1.56	-0.85	3028G
32	FB 7683 BILLY ALONSO-ET	TR	TP	994	29H019448	71136	1550	353	96	2.99	4.7	89	1.4	-0.6	0.24	95	0.51	-0.44	-0.60	3013G	
33	SYNERGY RENEGADE ZZ TOP-ET	TR	TP	994	7H015471	80	91	1938	285	97	2.97	3.3	88	-4.3	1.0	0.39	84	1.40	1.27	0.10	3013G
34	MATCREST RIVETING GORDY-ET	TR	TP	994	14H016301	65109	1897	315	99	2.77	5.6	89	1.8	0.5	0.43	92	1.11	-0.16	-1.19	3012G	

© 2024 HOLSTEIN ASSOCIATION USA, INC.

TRANSFER EMBRYÍ - SKOT

- ✘ výběr dárců a příjemců
- ✘ synchronizace dárců a příjemců
- ✘ superovulace
- ✘ inseminace
- ✘ odběr embryí
- ✘ vyhledání a posouzení embryí, mikromanipulace
- ✘ přenos embryí

GONADOTROPINY

- ✗ **FSH**
 - + krátký poločas rozpadu
 - + opakovaná aplikace
 - + dávka 24-66 mg
- ✗ **eCG**
 - + dlouhodobý účinek (antisérum) dávka 2500-3500 m.j.
- ✗ **hMG**
 - + experimentálně

AKTUÁLNĚ DOSTUPNÉ PREPARÁTY OBSAHUJÍCÍ FSH A LH

- ✗ Pluset
- ✗ Folltropin
- ✗ Stimufol

SCHÉMA SUPEROVULACE A PŘENOSU

	Dárci		Příjemci
	7 ⁰⁰	19 ⁰⁰	
D0	FSH	FSH	
D1	FSH	FSH	PG
D2	FSH + PG	FSH + PG	
D3	FSH	FSH	
D4	Inseminace	Inseminace	Říje
D5			
D6			
D7			
D8			
D9			
D10			
D11	Odběr embryí		Přenos

ODBĚR EMBRYÍ

- ✗ Izolovaná děloha po porážce
- ✗ Chirurgický odběr po laparotomii
- ✗ Konzervativní odběr transcervikální cestou
 - gravitační metoda
 - frakcionovaná metoda

Embryo evaluation

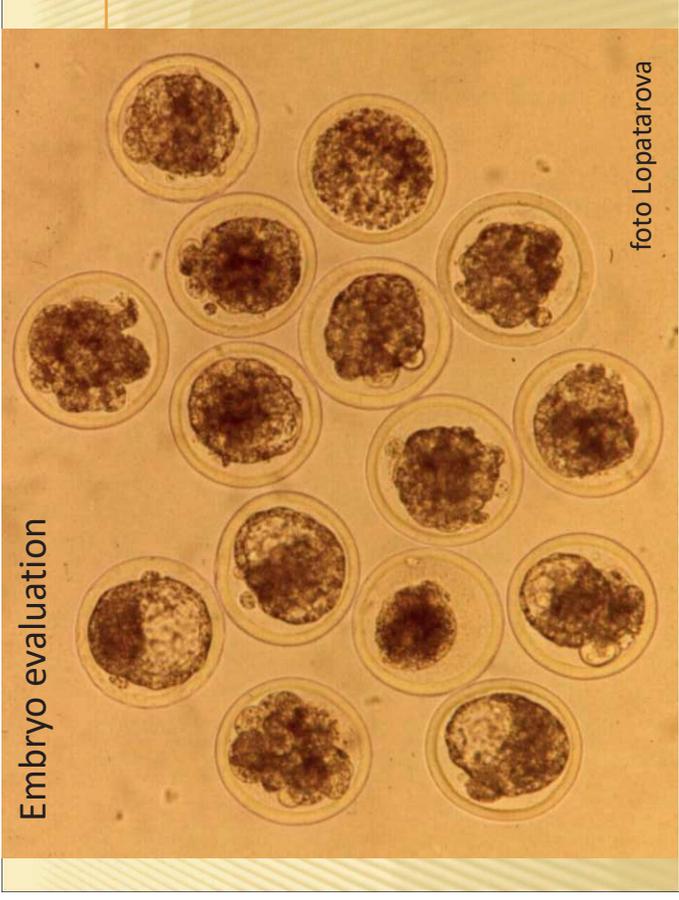


foto Lopatarova

MIKROMANIPULACE S EMBRYI

- ✗ Příprava pro transfer
- ✗ Kryokonzervace
- ✗ Embryo biopsy – sexace, genomická testace
- ✗ Embryo splitting
- ✗ Zona drilling
- ✗ Odnětí vyloučených blastomer (mikrochirurgie)

TRANSFER EMBRYÍ

- ✗ Chirurgický transfer (historie)
- ✗ Transcervikální transfer

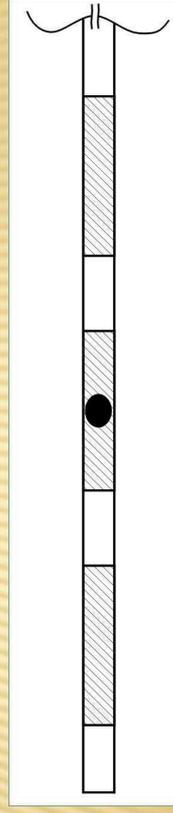
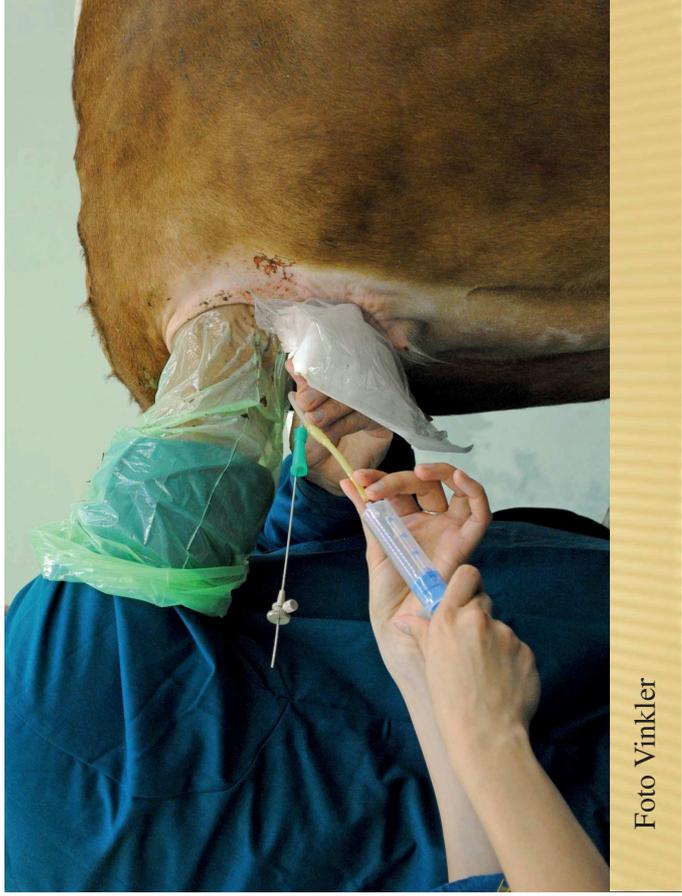


Foto Vinkler

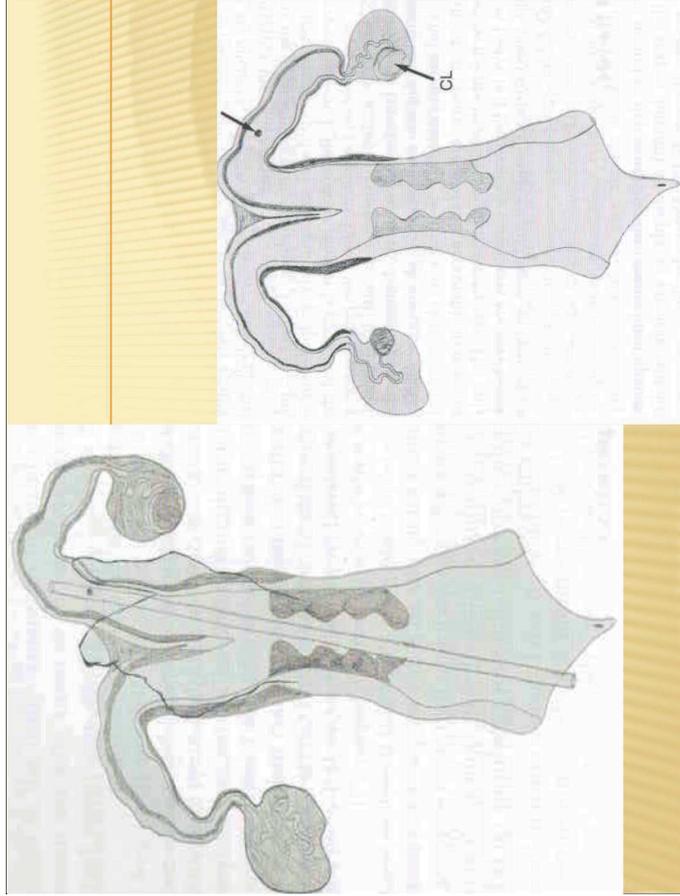


EMBRYOTRANSFER



VÝSLEDKY ET

- ✘ Zisk 5 - 8 embryí vhodných k přenosu z jedné SO
- ✘ Zabřezávání příjemců 50 - 80 %



IVP - IN VITRO EMBRYO PRODUCTION

- Odběr oocytů
- IVP
- Přenos IVP embryí

DÁRCI OOCYTŮ

- ✗ Nejhodnotnější zvířata
- ✗ Zvířata neschopná produkce embryí ve vlastním těle
 - + superovulační responze (stáří, infertilita)
 - + onemocnění vejcovodů, dělohy, krčku
- ✗ Březí zvířata
- ✗ Telata - jalovičky starší 2 měsíců

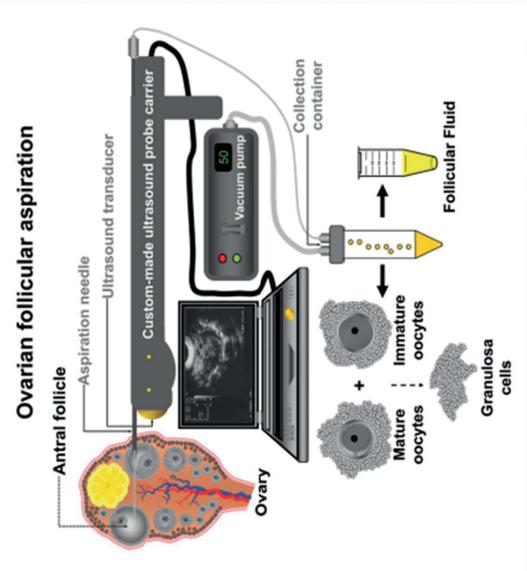
ODBĚR OOCYTŮ

- ✗ Preparační a kultivace folikulů
 - + izolované vaječnky
- ✗ Aspirace folikulů
 - + izolované vaječnky
 - + laparotomie
 - + laparoskopie
 - + transvaginální sonografická aspirace (ovum pick-up, OPU)
 - + transvaginální endoskopie

OPU

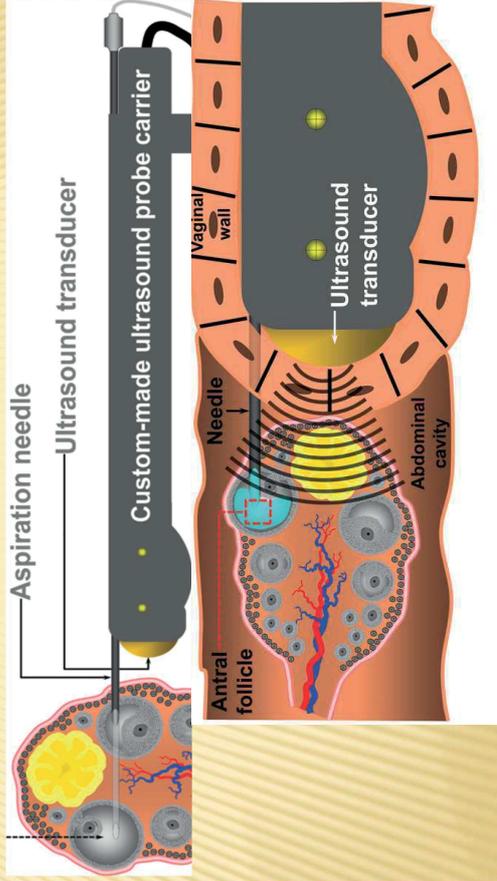
- ✗ UTZ sonda s držákem
- ✗ Punkční jehly
- ✗ Podtlaková pumpa
- ✗ Sběrný systém (hadičky, nádoby)

OPU

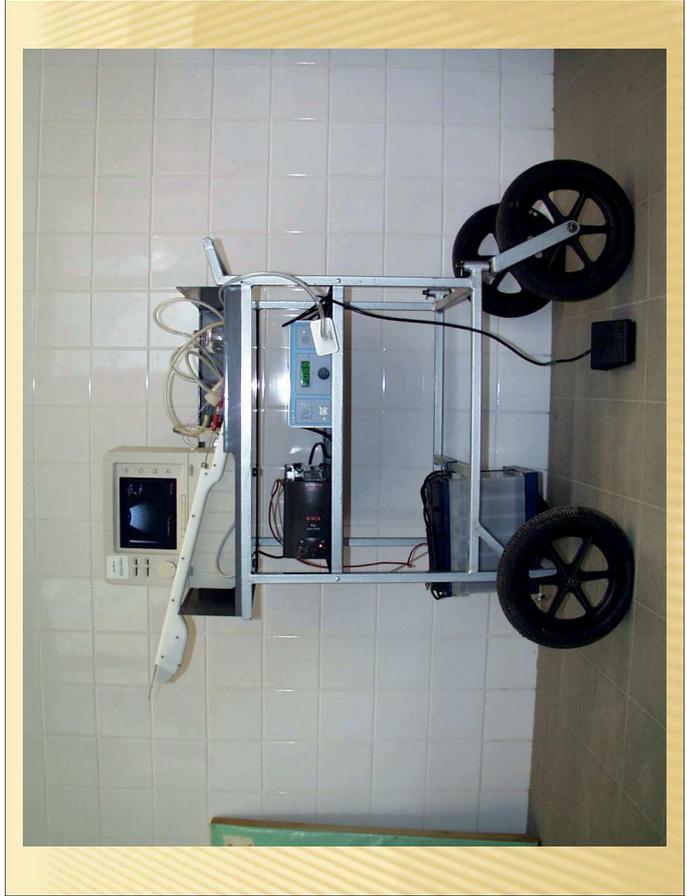


Velazquez 2014

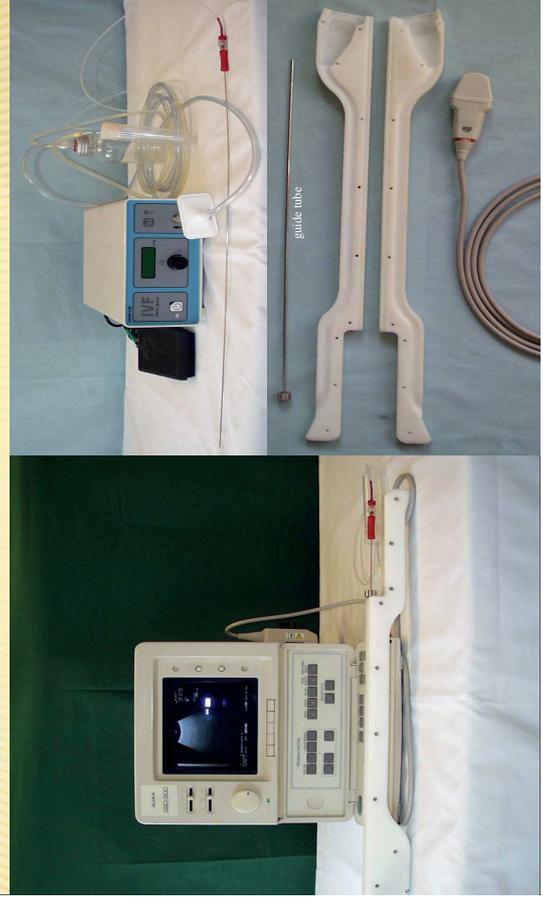
OPU



Velazquez 2014



OVUM PICK-UP



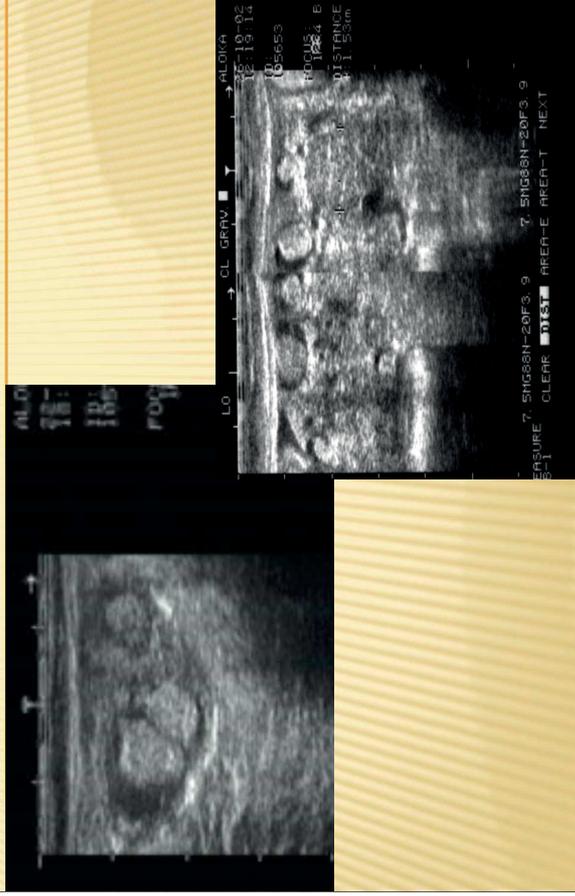
OPU



Ferré et al. 2022

Vyhavení pro OPU: (a) zařízení EssentiaPhe Medical OPU (Bois and Stout 2018), (b) Aspirace jehla s dvojitým lumenem systém (CooperSurgical, Inc.), odpovídá výše a ultrazvuk Aloka (Aloka SSD-500, Aloka Co., LTD), (c) Olejová výševa, dvojitý feder lumen aspirací mikrojet jehly (CooperSurgical, Inc.) a ultrazvuk Aloka (Aloka SSD-500, Aloka Co., LTD), (d) Bezolejový digitální vakuový systém (Cook brožura k vakuovému čerpadlu), (e) Nanonatorní konverzní sonda a jednorázový drák jehly (systém Mintatube OPU), (f) mikrokonverzní sonda a mikrojet vodicí jehly (WTA Vet, Brazil), a (g) mikrokonverzní sonda (Ministry Animal Medical Technology Co., LTD).

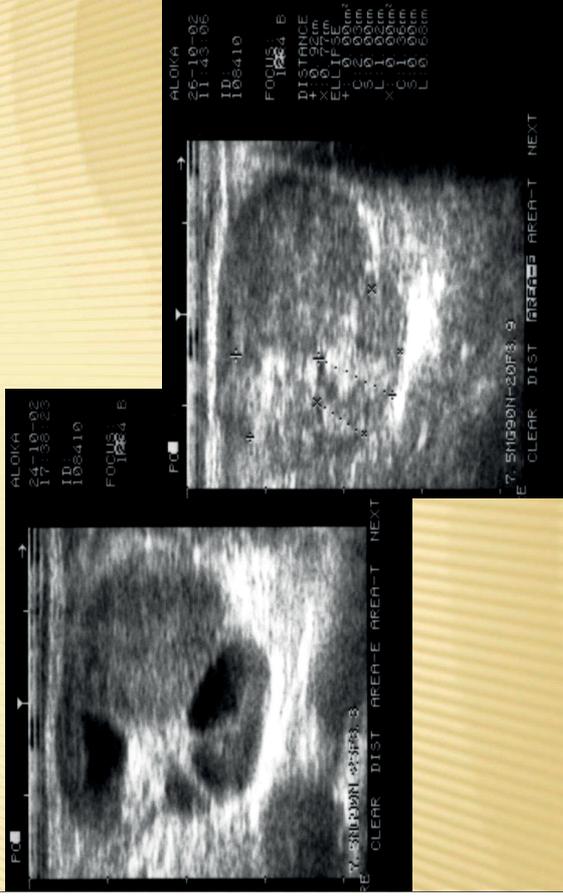
Změny na vaječnicích po OPU



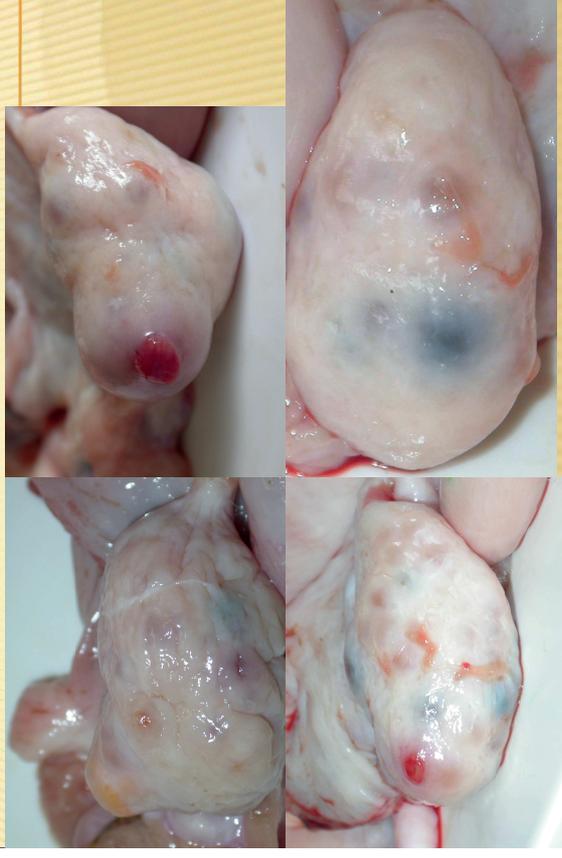
Změny na vaječnicích po OPU



Změny na vaječnicích po OPU



Změny na vaječnicích po OPU



OPU

- ✗ Opakovaná aspirace bez výrazných změn na vaječnicích
- ✗ Aspirace folikulů větších než 2 mm
- ✗ Schémata aspirace
 - + 1x týdně
 - + 2x týdně
 - + 2x měsíčně po superstimulaci
 - + gravidní zvířata až do 3. - 4. měsíce

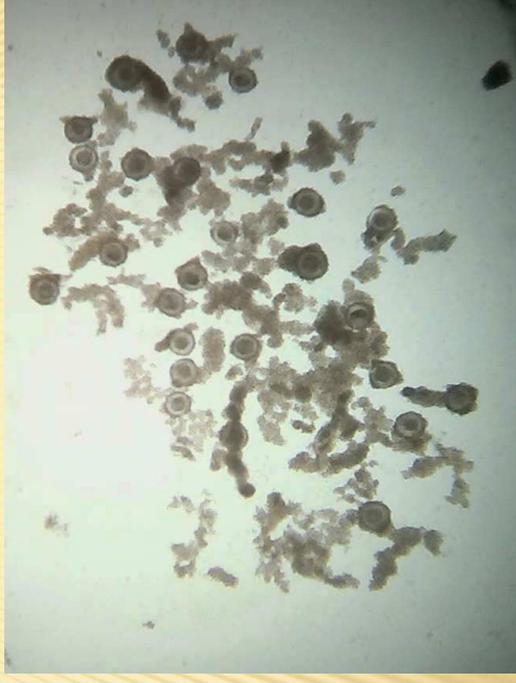
IVP - IN VITRO PRODUKCE

- ✗ IVM - in vitro maturace
- ✗ IVF - in vitro fertilizace
- ✗ IVC - in vitro kultivace

MATUROVANÉ OOCYTY



FERTILIZOVANÉ OOCYTY



IVP EMBRYA



VÝSLEDKY IVP

Nedosahují úrovně MOET, velmi variabilní

- ✘ Produkce 20 - 40% přenosuschopných embryí z oocytů zařazených do IVP
- ✘ Zabřezávání příjemců 50 - 60%
- ✘ Vlastnosti potomstva
 - + delší gestace
 - + vyšší porodní hmotnost (LOS, císařské řezy)
 - + více byčků
 - + kongenitální malformace
 - + perinatální mortalita

EMBRYOTRANSFER

- ✗ Skot
 - 2000: 580 tis. transferů
 - 480 tis. IVD (in vivo derived)
 - 100 tis. IVP (in vitro produced)
- 2021: 1350 tis. transferů
- 350 tis. IVD
- 1000 tis. IVP

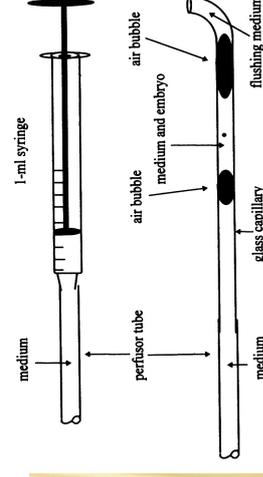
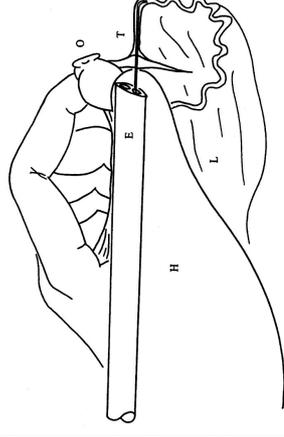
Bypass IVP

- ✗ Transvaginální endoskopie
- ✗ Intrafolikulární transfer oocytů

Transvaginální endoskopie

- ✗ Aspirace folikulů
- ✗ Tubární transfer embryí
 - Snaha zkrátit externí periodu (in vitro) vývoje embryí (bez nevýhod chirurgických metod nebo laparoskopie z fossa paralumbaris).
 - Po tubárním transferu 2-4 buněčných embryí v D2 následuje klasický odběr a přenos v D7.

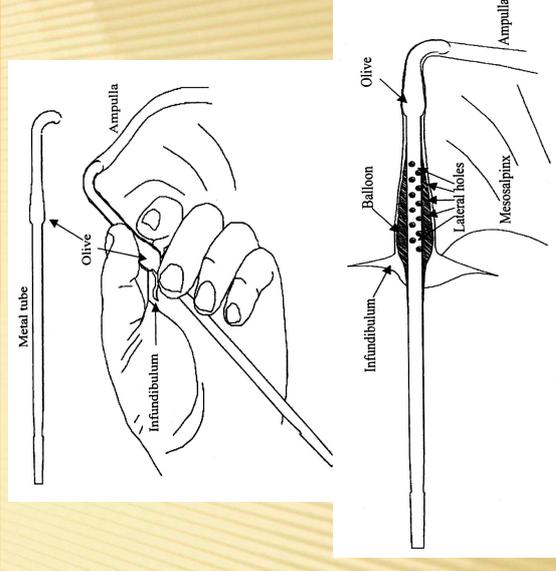
TUBÁRNÍ TRANSFER EMBRYÍ



Odběr embryí v tubární fázi vývoje

- Standardní odběrový katetr zaveden do dělohy.
- Kovová oliva pomocí endoskopu zavedena do vejcovodu (fixace per rectum prsty).
- Vejcovod propláchnut 40 - 60 ml média, které vytéká katetrem zavedeným v děloze.
- Standardní výplach dělohy (300-500 ml média).

Odběr embryí v tubární fázi vývoje



Intrafolikulární transfer oocytů

Oocyty injikovány do říjového folikulu
Inseminace
Ovulace, prostup embryí vejcovodem, vývoj embryí v děloze
Odběr embryí

DĚKUJI ZA POZORNOST

Nové trendy v přípravě embryí skotu *in vitro*

Martin Anger, VUvEL



Trocha historie....

První embryotransfer u skotu ?

“Prima” - 19. 12. 1950

Elwyn Willett

American Foundation for the Study of Genetics

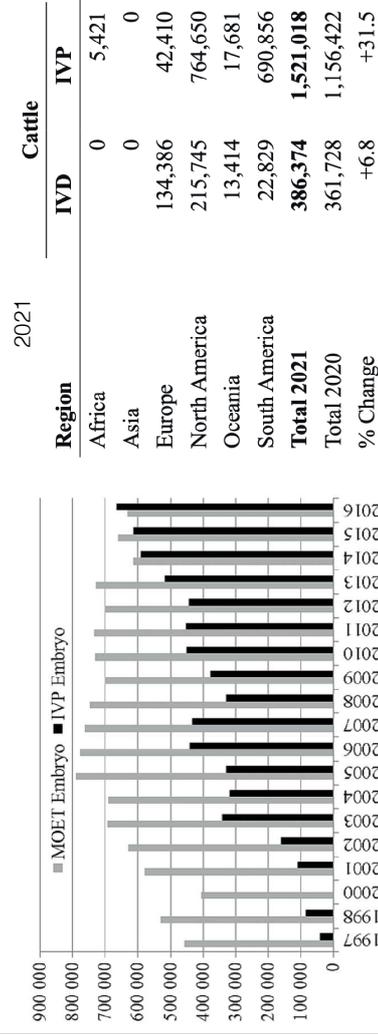


První embryotransfer po inseminaci mraženým semenem ?

“Frosty” - 29. 05. 1953

První chip čip o vysokém pokrytí genomu pro skot 2009

Současnost - dominance IVP



Ferré et al., 2020

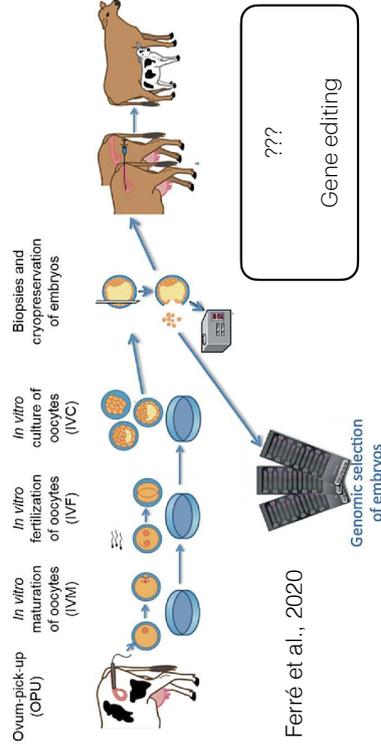
Viana et al., 2022

Současnost - selekce na úrovni genomu

Kombinace:

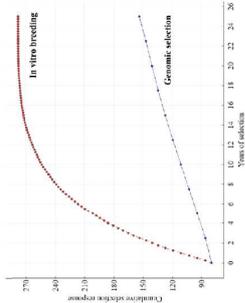
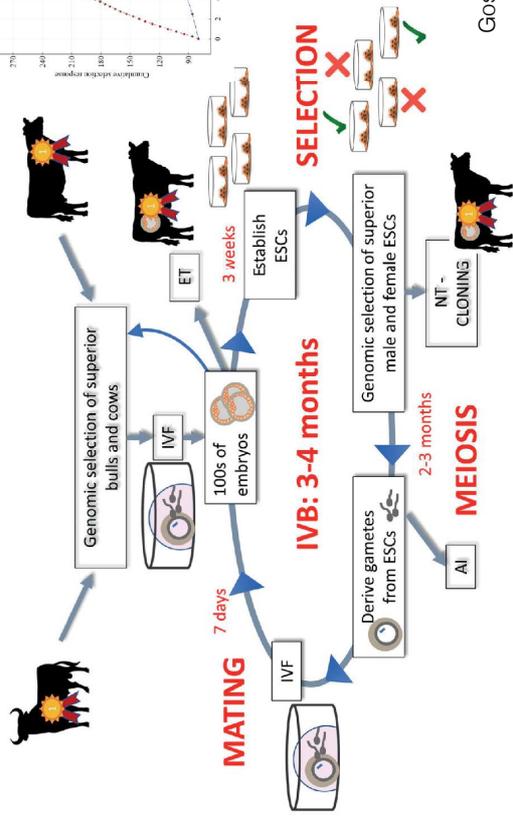
- *in vitro* produkce embryí (IVP)
- Sexovaného semene (SS)
- Selekcce na úrovni genomu (GS)

Tvoří dnes páteř úspěšného chovu skotu v USA, Kanadě a Evropě



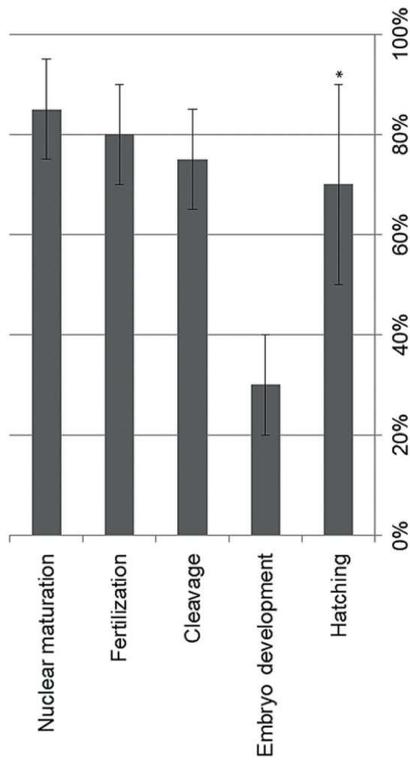
Ferré et al., 2020

Budoucnost - šlechtění *in vitro*



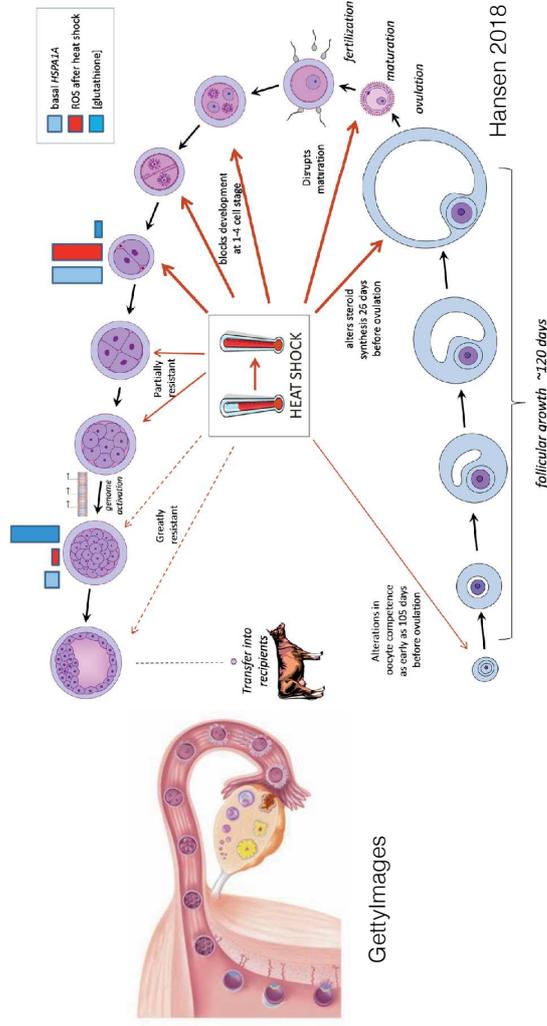
Goszczynski et al., 2019

Produkce embryí *in vitro* je **nejslabším** článkem celého řetězce



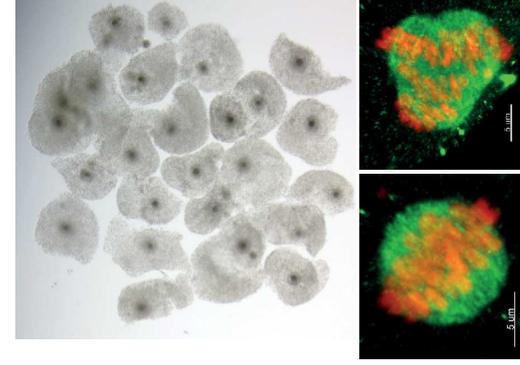
Ferré et al., 2020

Vývoj oocytu a embrya skotu



GettyImages

Kvalitní vajíčko - základ embryonálního vývoje



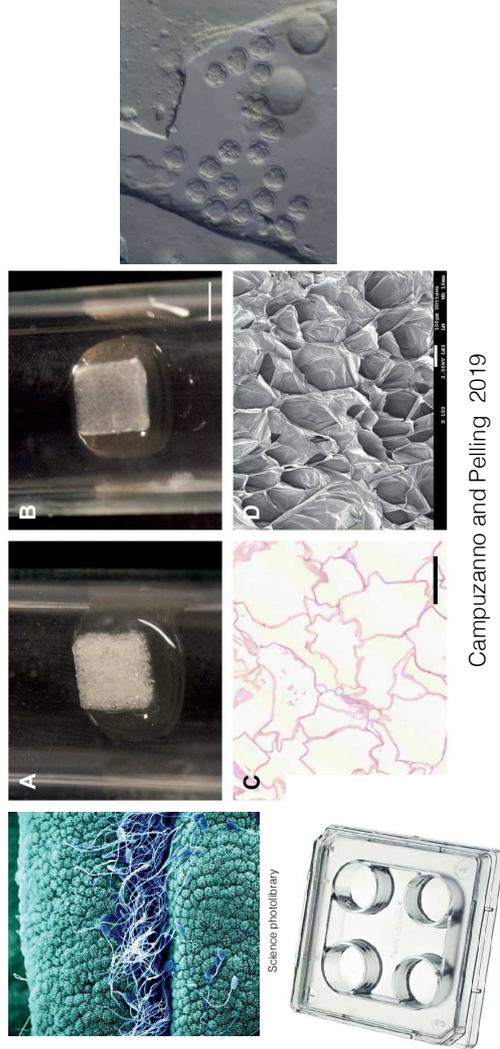
Získání meiotické a vývojové kompetence souvisí hlavně s velikostí oocytu

Maturace oocytů *in vivo* - kvalita ovlivněná původem zvířat, průběhem stimulace a také technickými aspekty získávání a transferu vajíček do laboratoře

Maturace oocytů *in vitro* - kvalita ovlivněná původem zvířat, kultivačním prostředím (suplementy médií), tenzí O₂ atd. Nutná kontrola výsledků maturace - expanze kumulárních buněk a zrání oocytu.

Možnosti ovlivnění kvality oocytů souvisí především s optimalizací přípravy OPU a výkonu OPU a s úpravou kultivačního prostředí při maturaci *in vitro*. Maturace ve folikulu!

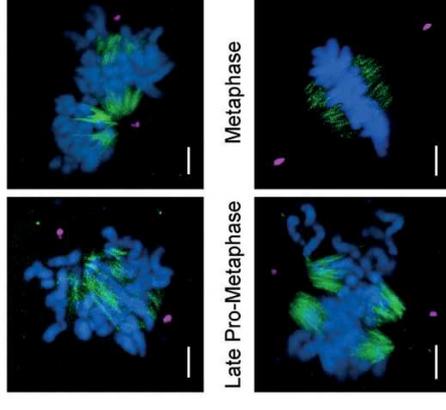
3D kultivace - napodobení prostředí ve vejcovodu, řízené uvolňování bioaktivních molekul



Campuzano and Pelling 2019

Výsledky publikované v nedávné době důležité pro produkci embryí *in vitro*

D Prophase Early Pro-Metaphase Late Pro-Metaphase Metaphase



REPORT Dual spindles assemble in bovine zygotes despite the presence of paternal centrosomes

Isabell Schneider¹, Mutsaer Roger Villaz^{2,3*}, Ji Julius Hovavari², Tom A.E. Stout⁴ and Jan Ellenberg¹

Výsledky publikované v nedávné době důležité pro produkci embryí *in vitro*

Article <https://doi.org/10.1038/s41591-022-02108-3>

Leukocyte telomere length in children born following blastocyst-stage embryo transfer

Received: 5 April 2022

Accepted: 25 October 2022

Published online: 15 December 2022

Check for updates

Cheng Wang^{1,2,3,4,5}, Yunyun Gu^{1,2,3,4}, Jun Zhou^{1,3,4}, Jie Zhang^{2,3,4}, Xiufeng Ling^{1,4,5}, Hong Li^{1,3,4,5}, Jingmin Hu⁶, Bei Xu⁷, Bo Zhang⁸, Na Qin^{1,2}, Hong Lv^{1,2}, Weiwei Duant¹, Yue Jiang^{1,2}, Yuanlin He^{1,2}, Tao Jiang^{1,6}, Congcong Chen⁷, Xiumei Han⁷, Kun Zhou^{1,2}, Bo Xu^{1,2}, Xinyu Liu^{1,2}, Shiyao Tao^{1,2}, Tingting Jiang^{1,2}, Jiangbo Du^{1,2}, Juncheng Bai^{1,2}, Feiyang Diap^{1,2}, Chuncheng Lu^{1,2}, Xuejiang Guo¹, Ran Huo¹, Jiayin Liu^{1,6,7}, Yuan Lin^{1,6,7,8,9}, Yanlai Xia^{1,2}, Guangfu Jin^{1,2,9}, Hongxia Ma^{1,2,9}, Hongling Shen^{1,2,5,2} & Zhibin Hu^{1,2,5,2}

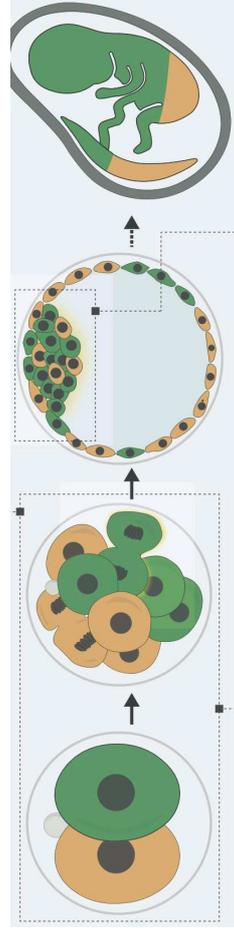
In conclusion, we found that the transfer of blastocyst-stage embryos was associated with shorter LTL in children than is the transfer of cleavage-stage embryos. This explains the shorter LTL in children conceived by ART than by spontaneous pregnancy. Based on our findings, we suggest that the long-term consequences of ART, particularly for aging-related phenotypes, need to be evaluated in children conceived by ART.

Výsledky publikované v nedávné době důležité pro produkci embryí *in vitro*

The first two blastomeres contribute unequally to the human embryo

Authors

Sergi Junyent, Maciej Meglicki, Roman Vetter, ..., Richard J. Paulson, Dagmar Iber, Magdalena Zernicka-Goetz



Junyent et al., 2024, Cell 187, 1–17
May 23, 2024 © 2024 The Author(s). Published by Elsevier Inc.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2024.04.029>

Genomika v reprodukčním managementu iGenetika.cz cloudDNA

Českomoravská společnost chovatelů, a.s.



David Lipovský

ICAR

ICAR

CERTIFICATE
OF QUALITY

www.iGenetika.cz

Genotypování stád / reprodukční obrat stáda

- spojitost genotypování a reprodukce
- specifika ČR
- data driven managment
- budoucnost - příležitosti **X** hrozby



www.iGenetika.cz



CERTIFICATE
OF QUALITY

Genomika jako standardní nástroj

- Genomická selekce se stala standardním nástrojem pro urychlení genetického pokroku
- Umožňuje zvýšit intenzitu a přesnost selekce spolu se zkrácením generačního intervalu
- Zvyšování genetického zisku



www.iGenetika.cz



CERTIFICATE
OF QUALITY

Genomika jako standardní nástroj

- Výsledky genotypování definují skupiny pro cílené připarování
- Kombinace s individuálními připarovacími plány
- Použití sexovaného semene
- Nejhorších 40% stáda – beef on dairy



www.iGenetika.cz



CERTIFICATE
OF QUALITY

Specifika ČR

- vysoká koncentrace zvířat na farmách
- průměr stáda > **260 ks**
- moderní technologie
- aktivometry
- neobvykle vysoké zapojení do plošných genotypovacích projektů



www.iGenetika.cz



Data driven management

- více než kdykoli dříve je reprodukce ovlivněna získávanými daty
- užítkovost (KU, VVP)
- zdravotní status (DN, senzory)
- vyhledávání říjí (aktivometry)
- plemenné hodnoty (gPH, QTL)



www.iGenetika.cz



budoucnost příležitosti X hrozby

- Kazachstán a Ázerbájdžán
- poptávka po **1,5 M** jalovic
- to je **67 500 000 Kč**
- kdo si ukousne z koláče?
- AT, PL, FR? (menší koncentrace), Itálie? (problematická doprava), Německo a ČR - výhodná poloha, koncentrace i management



www.iGenetika.cz



budoucnost příležitosti X hrozby

- evropská politika **omezování emisí** skleníkových plynů
- V porovnání s čistokrevnými mléčnými telaty mohou telata **B-on-D** poskytovat **kvalitnější produkty** z hovězího masa (bez dopadu na současnou efektivitu produkce mléka)
- Telata B-on-D vykazují **vyšší efektivitu krmení**, což snižuje ekologickou stopu.
- Vyšší efektivita krmení významně snižuje emise skleníkových plynů.
- B-on-D přináší větší objemy jatečně upravených těl hovězího masa vyšší jakosti (lepší finanční situace pro výkrmny).
- **Genomická selekce** ve stádech dojnic jako **klíčový faktor**



www.iGenetika.cz

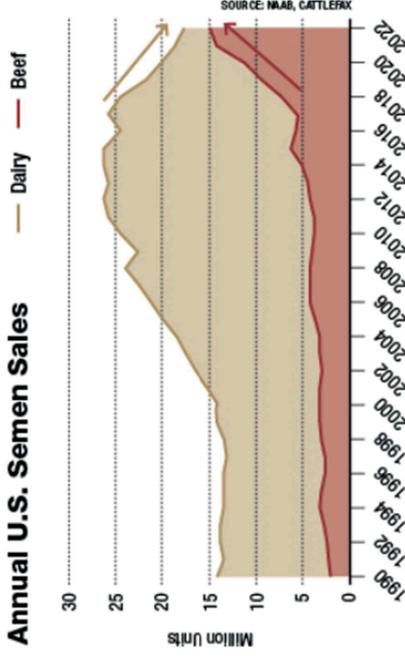


budoucnost příležitosti X hrozby

- Welfare – odrohování
- Používání hormonálních přípravků
- Nedostatek odborně zdatného personálu
- Genomika identifikuje homo a **heterozygotně** bezrohé jedince
- Sexované ID bezrohých býků

Beef on Dairy

Annual U.S. Semen Sales



Beef on Dairy

Total Potential Beef-on-Dairy Supply in North America

- 9.4MM dairy cows in the US
- **Approximately:**
 - 80% Holstein → 7,500,000 cows
 - 10% Jersey → 940,000 cows
 - 10% Crosses/Other → 940,000 cows
- **At steady state, approximately 40% of the herd can be bred to beef bulls:**
 - Potential for 3,760,000 beef-on-dairy calves annually



World Congress Technical Speaker
Dr. Kee Jim - Beef on Dairy



budoucnost příležitost pro ČMSCH, a.s

Laboratoř pro sexování inseminačních dávek



Programy plošného genotypování

Fit Cow - Holštýn Cattle Genom - Čestr 25% jalovic ročně již v programech



www.iGenetika.cz



www.iGenetika.cz



Softwarová podpora genotypování

iGenetika.cz cloudDNA genomika



www.iGenetika.cz



iGenetika.cz

iGenetika.cz - „e-shop“ systém pro genotypování



ČESKOMORAVSKÁ SPOLEČNOST CHOVATELŮ

Správa objednávek

Vyvořit novou objednávku | Exportovat katalogové listy | Export dat pro cloudDNA | Import objednávky

Zrušit výběr (0) | Filtr (991) | Vypaně (0) | Filtr (991) | Vypaně (0)

Přehled objednávek

Upr. číslo v A	Dat. vyřad. v A	Dat. proc. v A	Vozek	Dat. izot. v A	izot.	Laboratorní číslo v A	Plemeno	Pohl.	Chip ID	Chovatel v A	Typ obj.	Dat. doruč. v A	Kat. list
CZ00066142064	01.10.2020	ČHL...	08.10.2020	Ans	2022377E	H100	Býk	204628580705	AGRAS Bohdajov, a.s.	1 4	06.10.2020	Ne	
CZ00066137064	01.10.2020	ČHL...	08.10.2020	Ans	2022377E	H100	Býk	204628580705	AGRAS Bohdajov, a.s.	1 4	06.10.2020	Ne	
CZ000703337964	01.10.2020	ČHL...	08.10.2020	Ans	2022377E	H100	Kůva	204628580705	AGRAS Bohdajov, a.s.	1 4	06.10.2020	Ne	
CZ000703336964	01.10.2020	ČHL...	08.10.2020	Ans	2022377E	H100	Kůva	204628580705	AGRAS Bohdajov, a.s.	1 4	06.10.2020	Ne	
CZ000703339164	01.10.2020	ČHL...	08.10.2020	Ans	2022377E	H100	Kůva	204628580705	AGRAS Bohdajov, a.s.	1 4	06.10.2020	Ne	
CZ000703338464	01.10.2020	ČHL...	08.10.2020	Ans	2022377E	H100	Kůva	204628580705	AGRAS Bohdajov, a.s.	1 4	06.10.2020	Ne	



www.iGenetika.cz



www.iGenetika.cz



iGenetika JE UPRAVENA PRO MOBILNÍ ZAŘÍZENÍ

Nová objednávka

1. Údaje o zvířeti

Ušří číslo*
CZ000713707931

Příklad podporovaných formátů:
CZ000723456789, DE000723456789

Jméno
Pohlaví*
Kráva

Plemeno*
C100

Regist. zvířete
Datum narození
12.04.2020

2. Údaje o objednávce

Čárový kód
99678

Druh vzorku*
Chlupové cibulky

Druh objednávky*
ZAMÍŘENÍ testace SNP

Poznámka
Vše poznámka...

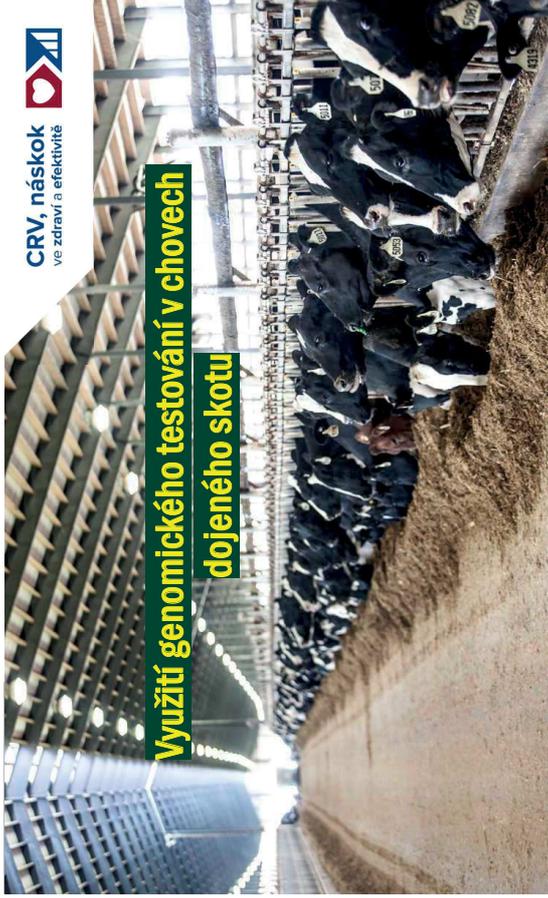
Předchozí



www.iGenetika.cz



Využití genomického testování v chovech dojeného skotu



Roman Hruďa
roman.hrud@crvcz.cz
606 722 583

Genomování plemenic - princip

Předpověď produkčních, zdravotních, fitness vlastností krav na základě analýzy DNA telete.

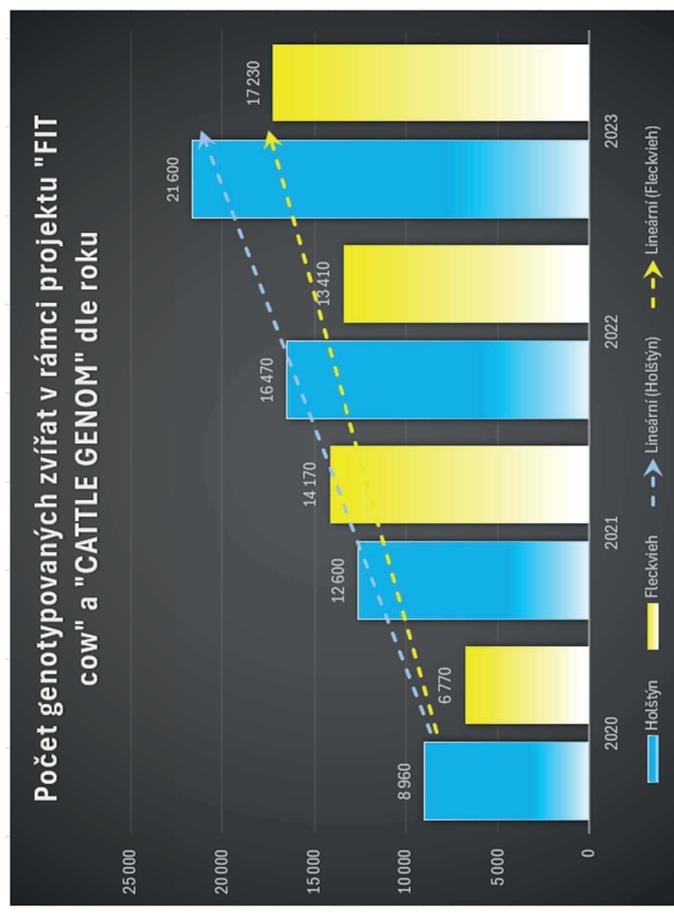
Zásadní je chovatelský cíl



Odhad počtu genotypovaných plemenic v ČR za rok 2023

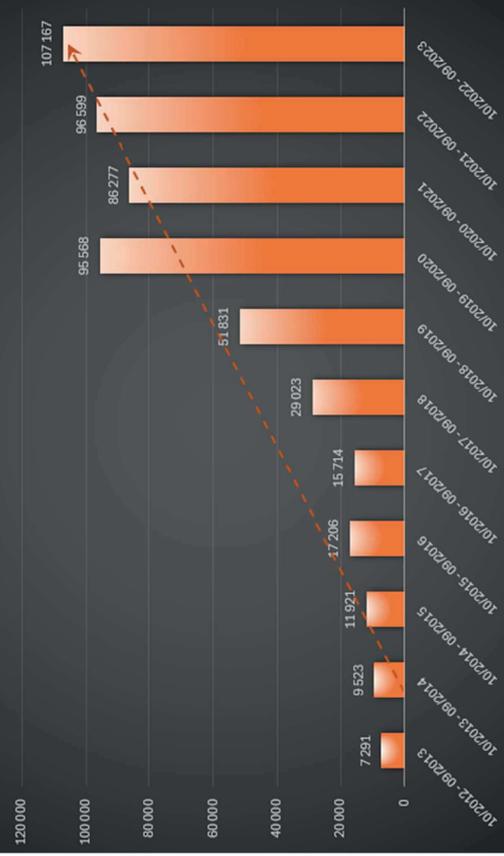
plemeno	cca počet narozených	cca odhad genotypovaných
holštýn	90 000	34 000
české strakaté	53 000	18 500

to znamená, že každá třetí narozená jalovička je nyní genomována



Rok 2023: plemeno Fleckvieh DEU a AUT

Počet genotypovaných zvířat plemene fleckvieh v DEU/AUT dle roku



HERDOPTIMIZER

Historie genomování holštýnských plemenic

- 2009 až 2011 první genomičtí býci v USA a Evropě
- 2012 - 2016 první genomované plemenice ve světě
- 2016 - 2018 první genomované plemenice v ČR
- 2019 první komerčně genomované jalovice v ČR
- 2023 každá třetí narozená jalovička v ČR genomovaná

2024 za rok genomováno 18 848 jalovic (CRV)

2024 celkem 55 holštýnských farem CZE + 10 SVK (CRV)

CRV
BETTER COWS > BETTER LIFE

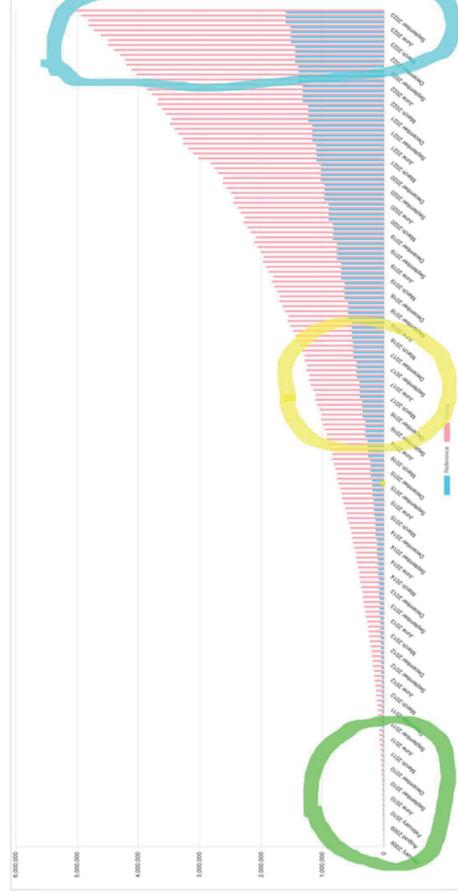
CRV, náskok
ve zdraví a efektivitě

HERDOPTIMIZER

CRV, náskok
ve zdraví a efektivitě

Historie genomování plemenic v USA

Genotypes included in Evaluations by Holstein
Comparison of Reference vs Young



holštýn
Projekt FIT COW



- 2023
- celkové výsledky za celou dobu projektu
 - 67 000 genotypovaných jalovic
 - 77 chovatelů = 20 % krav
 - 63 000 plemenic mělo vypočtené GEPH
 - 19 000 ukončilo 100 dnů laktace
 - 16 600 ukončených laktací
 - deník léčení
 - opravy původů z genomiky

CRV
BETTER COWS > BETTER LIFE

Referenční populace ve světě



Populace v Severní Americe USA-CDCB

Spojené státy americké USA

Kanada

Itálie

Velká Británie



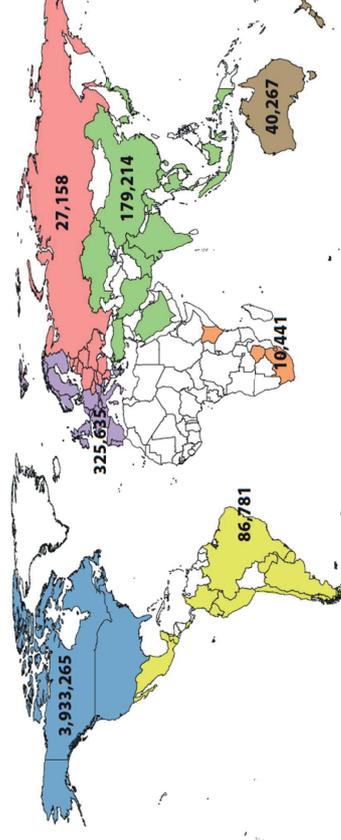
Referenční populace CDDBC

- referenční populace cca 40 000 býků
- genomované plemence: více než 6 mil. plemenic



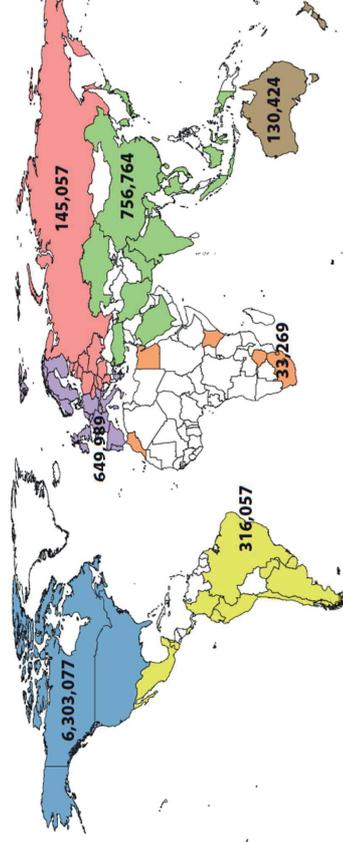
Rok 2020

Počty genotypovaných hoštýnských jalovic na USA – CDCB bázi



Rok 2024

Počty genotypovaných hoštýnských jalovic na USA – CDCB bázi



Referenční populace ve světě

Eurogenomics

- UNCEIA (Francie)
- CRV (Holandsko)
- DHV and vit (Německo)
- VikingGenetics (Dánsko, Švédsko)
- CONAFE (Spanělsko)
- Polsko



Referenční populace Eurogenomics

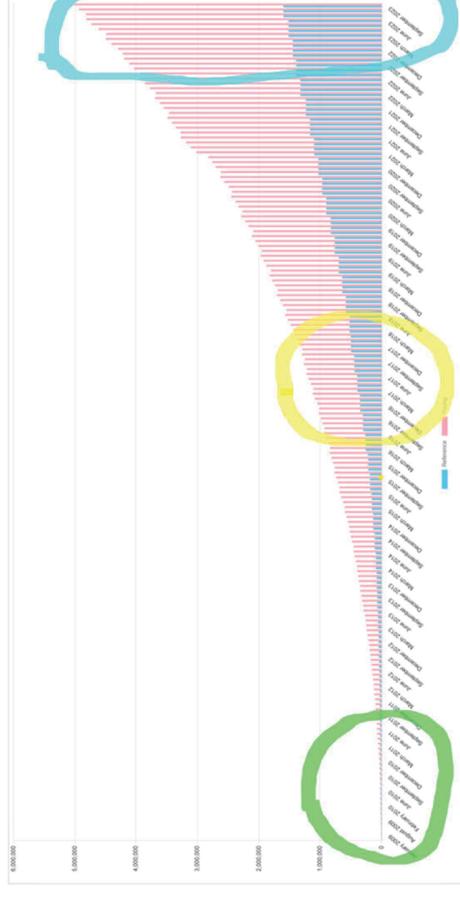
- referenční populace cca 40 000 býků
- plemence: více než 3 mil. plemenic



Historie genomování holštýnských plemenic

- 2009 až 2011** první genomické býci v USA a Evropě
- 2012 - 2016** první genomované plemenice ve světě
- 2016 - 2018** první genomované plemenice v ČR
- 2019** první komerčně genomované jalovice v ČR
- 2023** každá třetí narozená jalovička v ČR genomovaná
- 2024** za rok genomováno 18 848 vzorků jalovic (CRV)
- 2024** celkem 55 holštýnských farem CZE + 10 SVK (CRV)

Historie genomování plemenic v USA

 Genotypes included in Evaluations by Holstein
 Comparison of Reference vs Young


Genomování jalovic - věk

1. po narození
2. před připouštěním
3. březí

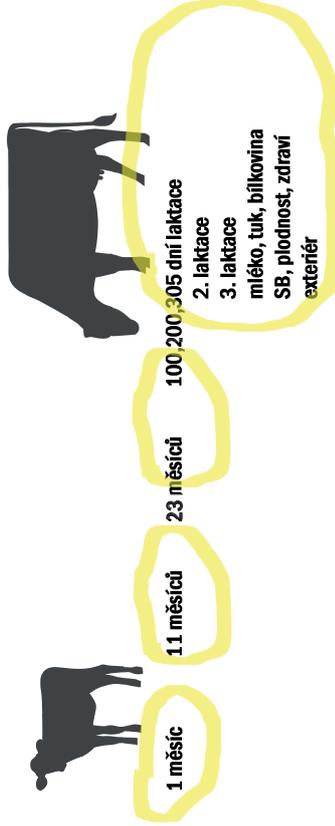
Genomování jalovic - ověření

1. první plemenná hodnota jalovičky
2. porovnáme se skutečnými výsledky krávy

Vyhodnocení chovatelského cíle

tele/jalovice
první genomické hodnoty

kráva
fenotyp



Genomování jalovic – chovatelský cíl

Hlavní problémy ověření výsledků jsou:

1. uchovat první plemenné hodnoty jalovičky
2. neporovnávat jednotlivé znaky (např. kg mléka) samostatně, ale celý chovatelský cíl

Nejpoužívanější hořšínské indexy v USA

	TPI	NIM\$	CM\$	DWP\$	Herd Health Profit \$	Grazing PRO
MLÉKO	0%	1%	-2%	1%	0%	-10%
TUK+BÍLKOVINA	44%	48%	48%	34%	37%	25%
Mastitis, SB	5%	3%	4%	13%	19%	5%
Plodnost dcer	13%	6%	5%	12%	11%	17%
Ostatní vlastnosti zdraví	9%	21%	20%	21%	17%	9%
Schopnost telení	2%	3%	3%	2%	1%	7%
Zdraví telat	0%	1%	1%	7%	0%	3%
Exteriér	25%	4%	4%	0%	8%	11%
Rámcj/konverze krmiva	-2%	-13%	-13%	-10%	-7%	-13%

Výsledky podle chovatelského cíle – MOŽNOST 1

CHOV1 ukončených 897 primních laktací



Výsledky podle chovatelského cíle

Průměry skupin pro sledované znaky

	TOP 25%	MID 50%	LOW 25%	rozdíl TOP/LOW
kgM	12 420	11 727	11 163	1 257
kgT	468	449	435	34
T%	3,78	3,84	3,91	-0,13
kgB	413	394	382	32
B%	3,34	3,37	3,43	-0,09
SB	93	119	116	-23
SP	97,5	94,2	92,4	5,2
VEM	78,9	78,7	78,5	0,4
KON	80,0	80,1	79,9	0,1

Výsledky podle chovatelského cíle - MOŽNOST 2

CHOV1 ukončených 897 prvních laktací

Výsledná váha znaků v indexu			
kg mléka	kg tuk	kg bílkovina	% bílkovina
7 %	30 %	30 %	0 %
Plodnost	Dlouhověkost	Somatické buňky	Vemeno
10 %	14 %	10 %	0 %
		Končetiny	
			0 %

Počet zvířat v percentilech dle kategorií

	TOP 25%	MID 50%	LOW 25%
Laktace 305	224	449	224
Somatické buňky	329	657	329
Servis perioda	250	491	228
Exteriér	294	588	294

HERDOPTIMIZER

CRV
BETTER COWS > BETTER LIFE

Výsledky podle chovatelského cíle

Průměry skupin pro sledované znaky

	TOP 25%	MID 50%	LOW 25%	rozdíl TOP/LOW
kgM	12 197	11 676	11 488	709
kgT	469	447	437	32
T%	3,86	3,85	3,82	0,04
kgB	413	393	385	28
B%	3,39	3,38	3,36	0,03
SB	98	115	117	-19
SP	97,3	94,7	91,8	5,5
VEM	78,7	78,7	78,7	0,0
KON	80,2	80,0	80,0	0,2

Výsledky podle chovatelského cíle - MOŽNOST 3

CHOV1 ukončených 897 prvních laktací

Výsledná váha znaků v indexu			
kg mléka	kg tuk	kg bílkovina	% bílkovina
1 %	22 %	22 %	0 %
Plodnost	Dlouhověkost	Somatické buňky	Vemeno
22 %	19 %	14 %	0 %
		Končetiny	
			0 %

Počet zvířat v percentilech dle kategorií

	TOP 25%	MID 50%	LOW 25%
Laktace 305	224	449	224
Somatické buňky	329	657	329
Servis perioda	250	491	228
Exteriér	294	588	294

HERDOPTIMIZER

CRV
BETTER COWS > BETTER LIFE

Výsledky podle chovatelského cíle

Průměry skupin pro sledované znaky

	TOP 25%	MID 50%	LOW 25%	rozdíli TOP/LOW
kgM	12 123	11 682	11 729	394
kgT	467	446	446	21
T%	3.86	3.83	3.82	0.05
kgB	411	393	392	19
B%	3.40	3.37	3.36	0.04
SB	96	120	126	-31
SP	95.4	92.7	93.2	2.2
VEM	79.2	78.6	78.5	0.7
KON	80.2	80.1	79.9	0.3

Výsledky podle chovatelského cíle - MOŽNOST 4

CHOV1 ukončených 897 prvních laktací

Výsledná váha znaků v indexu

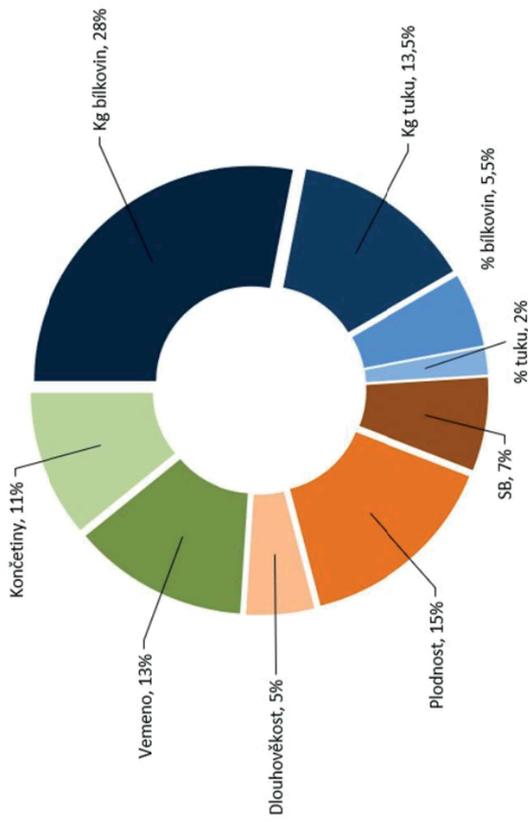
kg mléka	0 %	kg tuk	13 %	kg bílkovina	28 %	% tuk	2 %	% bílkovina	6 %
Plodnost	15 %	Dlouhověkost	5 %	Somatické buňky	7 %	Vemeno	13 %	Končetiny	11 %

Počet zvířat v percentilech dle kategorií

	TOP 25%	MID 50%	LOW 25%
Laktace 305	224	449	224
Somatické buňky	329	657	329
Service perioda	250	491	228
Exteriér	294	588	294

SIH

Produkce 49 %, Exteriér 24%, Funkční znaky 27%



Výsledky podle chovatelského cíle

Průměry skupin pro sledované znaky

	TOP 25%	MID 50%	LOW 25%	rozdíli TOP/LOW
kgM	12 010	11 716	11 777	233
kgT	464	448	445	19
T%	3.87	3.84	3.79	0.08
kgB	409	395	390	20
B%	3.42	3.38	3.32	0.10
SB	109	118	116	-6
SP	94.1	92.8	94.3	-0.2
VEM	79.6	78.6	78.0	1.6
KON	80.6	80.0	79.7	0.8

Výsledky podle chovatelského cíle - **MOŽNOST 4**

CHOV2 ukončených 400 prvních laktací



Počet zvířat v percentilech dle kategorií



HERDOPTIMIZER

CRV
BETTER COWS > BETTER LIFE

Výsledky podle chovatelského cíle - **MOŽNOST 4**

CHOV3 ukončených 554 prvních laktací



Počet zvířat v percentilech dle kategorií



HERDOPTIMIZER

CRV
BETTER COWS > BETTER LIFE

Výsledky podle chovatelského cíle

Průměry skupin pro sledované znaky



Výsledky podle chovatelského cíle

Průměry skupin pro sledované znaky



Z těchto 4 možností chovatelských cílů
ani jedna není obecně správná/špatná

Důležité je jak budete dále se stádem
PRACOVAT

Používat sexované dávky na všechny jalovice není dobrý
nápad

i když to většina chovatelů dělá

Daleko logičtější je používat sexované dávky na nejlepší
jalovice/prvotelky/druhovelky dle pořadí ve stádě

Zařazovat typ do ekonomického pořadí plemenic ve stádě
není dobrý nápad

Daleko efektivnější je řešit exteriérové nedostatky
jalovic/krav pomocí přípařovacího programu (SireMatch)

Plemenice se Vám ve stádě budou vždy řadit podle toho jak si
na stavíte šlechtitelský cíl

Důležité je toto pořadí dále
WYUŽÍT K DALŠÍ PRÁCI VE STÁDĚ

Nové poznatky v procesu MOET a IVP

Doc. MVDr. Svatopluk Čech, Ph.D.
Výzkumný ústav veterinárního lékařství Brno
Veterinární univerzita Brno

MOET

Multiple ovulation and embryo transfer

SUPEROVULACE

Faktory:

- + fáze cyklu (8. - 12.den cyklu)
- + dominantní folikul
- + plemeno, stáří, doba od porodu, užítkovost, konstituce
- + zevní prostředí (roční období, stress)
- + **gonadotropin**

GONADOTROPINY

- ✗ **FSH**
 - + krátký poločas rozpadu
 - + opakovaná aplikace
 - + dávka 24-66 mg
- ✗ **eCG**
 - + dlouhodobý účinek (antisérum) dávka 2500-3500 m.j.
- ✗ **hMG**
 - + experimentálně

AKTUÁLNĚ DOSTUPNÉ PREPARÁTY OBSAHUJÍCÍ FSH A LH

- ✗ Pluset
- ✗ Folltropin
- ✗ Stimufol

SCHÉMA SUPEROVULACE A PŘENOSU

	Dárcei		Příjemci
	7 ⁰⁰	19 ⁰⁰	
D0	FSH	FSH	
D1	FSH	FSH	PG
D2	FSH + PG	FSH + PG	
D3	FSH	FSH	
D4	Inseminace	Inseminace	Říje
D5			
D6			
D7			
D8			
D9			
D10			
D11	Odběr embryí		Přenos

Nové trendy v superovulaci skotu

Snížení počtu aplikací FSH

Produkce FSH s optimálním biologickým účinkem

Nové trendy v superovulaci skotu

Snížení počtu aplikací FSH

- jedna injekce FSH sc
- opakovaná injekce FSH 1x denně
- jedna injekce FSH v polyvinylpyrrolidonu
- jedna injekce FSH v aluminium hydroxid gelu
- epidurální injekce FSH
- injekce FSH do fossa ischioirectalis
- implantáty
- osmotická pumpa
- mikročástice

HYALURONAN

Sodná sůl kyseliny hyaluronové

Přirozeně se vyskytující glykosaminoglykan, lineární polysacharid složený z opakujících se disacharidových jednotek
Součást pojivové hmoty, kůže, očního sklivce, synoviální tekutiny...

Při použití jako solvens FSH zajišťuje postupné uvolňování hormonu

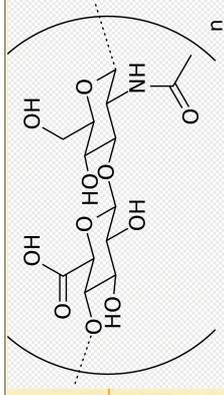
Hyaluronan v koncentraci 0,5%, 1%, 2%, 5% (10%)

Superovulace: 1 aplikace D0

2 aplikace D0 (2/3 dávky), D2 (1/3 dávky)

Superstimulace před OPU

Bonharten, Hyaluronan Bioveta



HYDROGELY

Biodegradovatelné polymery

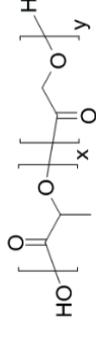
Poly (mléčná kyselina) PLA

Poly (mléčná-co-glykolová kyselina) PLGA

Injektovatelné hydrogely reagující na teplotu

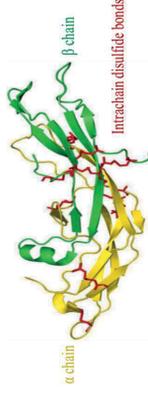
uchovávání v podchlazeném stavu
po injekci se zvýší teplota a léčivo se začne uvolňovat

Zásobníky pro lokální aplikaci léčiv, kmenových buněk, hormonů
Kontrolované uvolňování léčiva



PRODUKCE REKOMBINANTNÍHO FSH

- ✗ pFSH se používá k vyvolání superovulace déle než 40 let
- ✗ Hypofyzární extrakt
krátký poločas rozpadu
kontaminace LH a jinými proteiny
variabilita jednotlivých výrobních šarží
možná imunitní reakce



PRODUKCE REKOMBINANTNÍHO FSH

- ✗ Úsek DNA přenesen pomocí vektoru do cílových buněk (bakteriální, rostlinné, hmyzí, savčí)
- ✗ Produkce hormonu v bioreaktoru
- ✗ Výkon cca 30 pg/buňku/den
- ✗ Účinek rFSH srovnatelný s účinkem pFSH

První zprávy Looney 1988, Wilson 1993

PRODUKCE REKOMBINANTNÍHO FSH

✘ Jednořetězcový rekombinantní FSH
brscFSH (Cabeza et al. 2024)

Celková dávka 150 – 500 µg (cca 0,5 µg/kg)
4 - 7 dílčích sestupných dávek
Efekt superovulace 8 – 12 embryí

PRODUKCE REKOMBINANTNÍHO FSH

✘ Chimérický rekombinantní FSH
scbFSH (Abreu et al. 2023)

Leishmania tarentolae heterologní expresní systém
Klinický efekt není referován

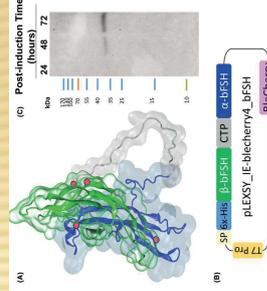


Fig. 1. Design and expression of the bovine FSH single-chain molecule. (A) Amino acid sequence of brscFSH. The signal peptide corresponding to the beta-chain of bovine FSH is shown in black and underlined. The FSH beta-chain is shown in red. The spacer chains are shown in light blue. The sequence of the bovine FSH alpha chain is shown in blue. The 6-residue histidine tag is shown in orange. (B) Three-dimensional model of the brscFSH molecule (top) interacting with its receptor, shown below in magenta. (C) Map of biclonal lentiviral vector encoding brscFSH. Within the viral particle, the region between the 5' and 3' LTRs is packaged. In this region, the cassette for brscFSH expression is formed, from 5' to 3', by an immediate-early cytomegalovirus promoter - a chimeric intron - the coding sequence for brscFSH - a LoxP site - an Internal Ribosome Entry Site (IRES) from oncopolyomavirids virus - a coding sequence for Green Fluorescent Protein (GFP) - a second chimeric intron - a second coding sequence for GFP. (D) SDS-PAGE gel showing the expression of brscFSH in supernatant from cells transfected with the pICW-brscFSH-LG plasmid used as a positive control (Rabbit IgG Secondary Antibody (LI-COR, Cat. 926-32211)). Supernatant from cells transfected with the pICW-brscFSH-LG, plasmid was used as a positive control (C+). As a negative control, the supernatant of untransfected cells was used. The reaction was visualized using the ODYSSEY GX imaging system and Image Studio software version 3.1 (<https://www.thermo.com/thermo/fluorescence-studio/resources>). (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the Web version of this article.)

Cabeza et al. 2024

79

REKOMBINANTNÍ FSH S DLÓUHODOBÝM ÚČINKEM

LArbFSH (Carvalho et al. 2014)
Jedna dávka 25 – 50 – 100 µg

bscrFSH (Gutierrez-Reinoso et al. 2022)
Jedna dávka denně po 4 dny
Celková dávka 170 µg, sestupné dávky 55, 50, 40, 25 µg

rbFSH (Baruselli et al. 2023)
Jedna dávka 25 – 50 – 100 µg

REKOMBINANTNÍ FSH S DLOUHODOBÝM ÚČINKEM

rhFSH (Viana et al. 2024)

Corifollitropin- α

Jedna dávka 7,5 – 30 μ g

Dávka pro superovulaci 20 – 25 μ g

μ g

Problém v dlouhodobém účinku!

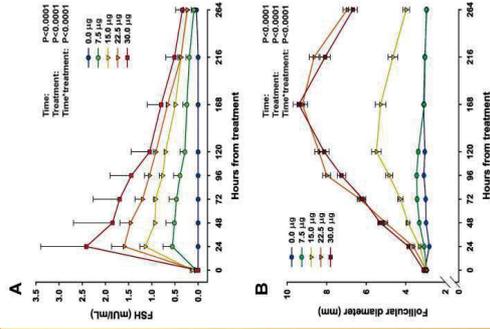


Fig. 1. A,B. Dose-response curves after a single sc injection with different concentrations of rhFSH (0.0, 7.5, 15.0, 22.5, 30.0 μ g) in a group of 100 Friesian Friesian (Friesian) heifers previously submitted to follicular wave suppression by immunization against GnRH. A) Serum rhFSH concentrations; B) average follicular diameter.

REKOMBINANTNÍ FSH S DLOUHODOBÝM ÚČINKEM

LA-rbFSH (Villaraza et al. 2024)

Hyperglykosylovaný FSH s prodlouženou bioaktivitou
Klinická studie s účinkem u zvířat zatím není

MODIFIKACE MOLEKULY FSH

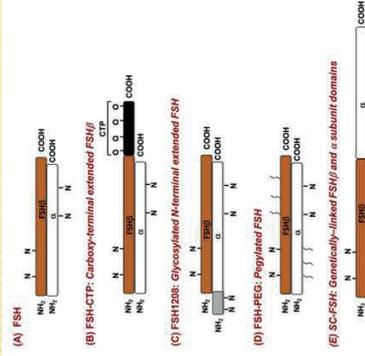


Fig. 2. FSH analogs designed for enhanced circulatory survival. A schematic representation of the heterodimeric FSH (A) and long-acting FSH variants (B-E). The amino- and carboxy-terminal end of the protein and the location of the N- and O linked glycans as well as polyethylene glycol additions (PEG) are labeled. (B) FSH-CTP: the sequence encoding the CTP domain of the NCG β subunit was genetically linked in frame to the 3' of the FSH β gene to create the elongated FSH β -CTP subunit that assembles with the α subunit to form a long-acting analog. (C) FSH1208: The N-terminal region of the FSH α subunit was genetically linked in frame to the 3' of the FSH β gene to create the elongated FSH β -N α subunit that assembles with the α subunit to form a long-acting analog. (D) FSH-PEG: The N-terminal region and, when combined with the FSH β subunit, the resulting heterodimer has prolonged $t_{1/2}$ relatively to the recombinant FSH. (E) FSH-PEG: a schematic illustration of PEGylated FSH variant that was modified with PEG residues (the zig zag lines). (E): SC-FSH: single-polypeptide chain encoding the α and FSH β subunits in tandem. A 'linker-less' design is shown where the two subunits are genetically fused without a spacer between the β -carboxy and α -amino ends.

IVP

In vitro embryo production

VYUŽITÍ PRE/PERIPUBERTÁLNÍCH DÁRKÝŇ OOCYTŮ

- ✗ Nejmladší jalovice jsou nejcennější kategorií dárců oocytů
- ✗ „Jvenilní produkce embryí in vitro“ juvenile in vitro embryo production (JIVET)

Intravitální odběr oocytů

- Od 6. měsíce OPU
- 2. – 5. měsíc laparoskopický přístup

VYUŽITÍ PRE/PERIPUBERTÁLNÍCH DÁRKÝŇ OOCYTŮ

- ✗ Oocyty získané od prepubertálních zvířat vykazují odlišnosti

Snížená meiotická kompetence
Nižší relativní produkce IVP embryí

VYUŽITÍ PRE/PERIPUBERTÁLNÍCH DÁRKÝŇ OOCYTŮ

- ✗ Kategorie nejmladších dárců poskytuje vysoké zisky oocytů
- ✗ 1 – 4 blastocysty z 1 odběru
- ✗ Vývoj postupů stimulace před odběrem
- ✗ Selektce dárců s vysokým počtem antrálních folikulů

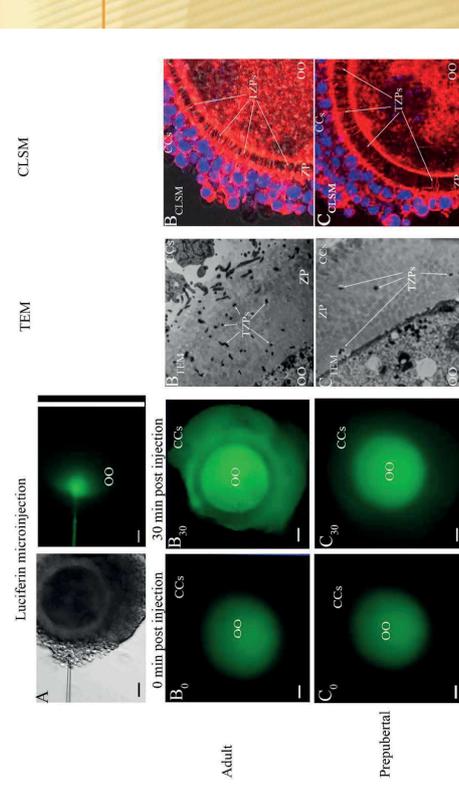


Fig. 2. Functional and structural intercellular communications in the cumulus-oocyte complexes (COCs) of adult and prepubertal ovine oocytes. Injection of the fluorescent dye Lucifer Yellow (LY) into oocyte cytoplasm by a microneedle (A). Junctional diffusion of LY from oocyte to cumulus cells (CCs) immediately after the injection the fluorescent dye is diffused in the oocyte cytoplasm in both adult (B₀) and prepubertal (C₀) COCs. After 30 min of culture LY is diffused into CCs compartment in the adult (B₃₀) while no diffusion was observed in the prepubertal COCs (C₃₀). Transmission electron microscope (TEM) section of adult (B₁) and prepubertal (C₁) oocytes for examination of transzonal projections (TZPs) of CCs through the zona pellucida (ZP). Laser scanning confocal microscopy (CLSM) images illustrating a detail of adult (B₂) and prepubertal (C₂) immature COCs following staining for F-actin (rhodamine phalloidin, red), DNA (Hoechst 33258, blue). Transzonal actin fibers are visible in TZPs connecting CCs to the oocyte (OO). Scale bar = 20 µm. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the Web version of this article.)

Breed	Age (mo)	COC retrieval	Pre-treatment (%)	IL ratio (%)	Control (%)	P-value	Ratio (%)	References
Hořstain	2-3	Laparot.	PA+FSH	11.0	--	--	--	Taneja et al. (2000)
Hořstain	2-3.3	LOPU	PA+FSH	8.9	--	--	--	Ballasarre et al. (2018)
Hořstain	2-3.3	LOPU	PA+FSH	12.8	--	--	--	Currin et al. (2017)
Hořstain	3	Abattoir	No	8.7	20.6	<0.05	42.2	Revel et al. (1995)
Hořstain	3	Abattoir	PA+FSH	10.5	27.0	<0.05	38.9	Revel et al. (1995)
Simmental	3	Abattoir	No	18.9	32.3	<0.05	58.5	Palma et al. (2001)
Unreported	2-4	Abattoir	No	11.4	30.1	<0.05	37.9	Kaufold et al. (2005)
Hořstain	3.3-4.3	LOPU	PA+FSH	17.1	--	--	--	Currin et al. (2017)
Hořstain	2.5-5.8	Laparot.	PA+FSH	6.0	40.0	<0.05	15.0	Damiani et al. (1996)
Hořstain	4-5	Laparot.	PA+FSH	10.0	--	--	--	Taneja et al. (2000)
Hořstain	5	OPU	No/FSH	0.0	18.0	<0.05	0.0	Presicce et al. (1997)
Hořstain	5	OPU	FSH	31.4	48.0	<0.05	65.4	Landy et al. (2016)
Hořstain	4.3-6	LOPU	PA+FSH	19.9	--	--	--	Ballasarre et al. (2018)
Hořstain	4.3-6	LOPU	PA+FSH	21.8	--	--	--	Currin et al. (2017)
Hořstain	4-7	Abattoir	No	22.5	41.3	<0.05	54.5	Camargo et al. (2009)
Hořstain	6	OPU	FSH	35.6	48.0	<0.05	74.2	Landy et al. (2016)
Hořstain	6-7	OPU	FSH	1.0	24.0	<0.05	4.2	Oropesa et al. (2004)
Hořstain	7	OPU	No	1.0	27.0	<0.05	3.7	Presicce et al. (1997)
Hořstain	7	OPU	FSH	17.0	27.0	<0.05	63.0	Presicce et al. (1997)
Hořstain	7	OPU	FSH	33.9	48.0	<0.05	70.6	Landy et al. (2016)
Hořstain	6-9	OPU	No	23.3	25.9	ns	90.0	Bernal-Ulloa et al. (2016)
Hořstain	6-10	OPU	No	17.1	20.4	ns	83.8	Gutiérrez-Añez et al. (2021)
Hořstain	8	OPU	FSH	37.9	48.0	<0.05	79.0	Landy et al. (2016)
Hořstain	6.7-9.7	OPU	No	16.9	24.8	ns	68.1	Majerus et al. (1999)
Hořstain	8.1-8.9	OPU	No	22.6	30.0	ns	75.3	Majerus et al. (1999)
Crossbred	9	Abattoir	No	9.4	--	--	--	Córdova et al. (2011)
Hořstain	9	OPU	No	7.0	29.0	<0.05	24.1	Presicce et al. (1997)
Hořstain	9	OPU	FSH	15.0	29.0	<0.05	51.7	Presicce et al. (1997)
Hořstain	9	OPU	FSH	32.0	48.0	<0.05	66.7	Landy et al. (2016)
Hořstain	9-10	OPU	FSH	9.0	24.0	ns	37.5	Oropesa et al. (2004)
Hořstain	10	OPU	FSH	33.5	48.0	<0.05	69.8	Landy et al. (2016)
Hořstain	<12	OPU	No	14.4	29.2	<0.05	49.3	Tratt et al. (2022)
Hořstain	11	OPU	No	24.0	41.0	<0.05	58.5	Presicce et al. (1997)
Hořstain	11	OPU	FSH	23.0	41.0	<0.05	56.1	Presicce et al. (1997)
Unkown	11	Opel	FSH	47.0	48.0	ns	87.5	Landy et al. (2016)



VYUŽITÍ PRE/PERIPUBERTÁLNÍCH DÁRKYŇŮ OOCYTŮ

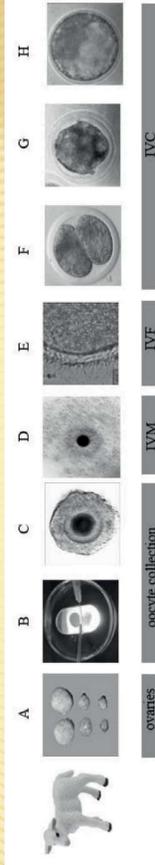


Fig. 1. Schematic sequence of steps in IVEP from prepubertal ewes (30-40 days old): ovaries with different morphology obtained from slaughtered lambs (A), ovarian slicing for oocytes collection (B); *in vitro* maturation (IVM) of oocytes cultured for 24 h; cumulus-oocyte complex (COC) (C), cumulus expansion after 24 h of incubation with gonadotropins (D); *in vitro* fertilization (IVF) with frozen-thawed ram semen (E); *in vitro* culture (IVC) of zygotes for 7 days; 2 cell-stage embryo (F), morula (G) and blastocyst (H).

Pasquartello et al. 2024

VYUŽITÍ MLADÝCH BÝKŮ

- ✗ Využití prepubertálních býků
- ✗ Zkrácení generačního intervalu

ekonomický tlak na chovatelské využít zvířat již v raném věku a na produkci maximálního počtu embryí od špičkových jedinců s využitím metod IVF, ICSI a embryotransferu

využití zárodečných buněk z intravitálně odebrané testikulární tkáně velmi mladých býků

je nutno vybrat vhodnou metodu odběru nepoškozující tkáň

HUMÁNNÍ MEDICÍNA

- ✗ Odběr spermií
- ✗ Z nadvarlat

Microsurgical epididymal sperm aspiration MESA
 Percutaneous epididymal sperm aspiration PESA

- ✗ Z varlat

Testicular sperm aspiration TESA
 Testicular sperm extraction TESE
 Microdissection testicular sperm extraction

HOSPODÁŘSKÁ ZVÍŘATA

- ✗ Intravitální získávání biologického materiálu z varlat samců hospodářských zvířat má dlouhou tradici (1953)
- ✗ Především pro diagnostiku patologických stavů
- ✗ Odběr zárodečných buněk přímo z varlat zatím v začátcích

- ✗ K metodě TESE se využívají komerčně dostupné instrumenty (Tru-cut, SuperCore) umožňující přesné řízení směru a hloubky zavedení aspirační jehly.



Figure 1. SuperCore™ Biopsy Instrument (B) (14 G x 9 cm) with Co-Axial Introducer Needle (A) (13 G x 3.9 cm). The biopsy needle has two tension points to pre-tension it, as the numbers 0, 1, and 2 illustrate. In the present study, tension was applied up to the second (2) tension point. At the tip of the biopsy needle (B) is the recess where the tissue sample can be found after the plunger has been pressed.

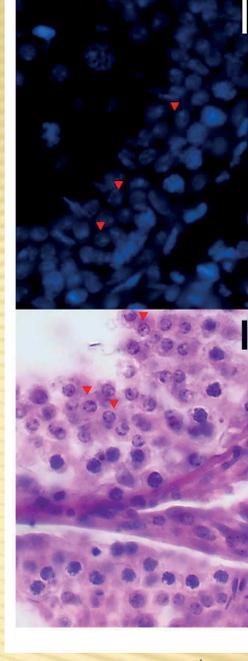
Rohlander et al. 2020

INTRACYTOPLAZMATICKÁ INJEKCE SPERMIE

- ✗ ICSI
- ✗ V posledních 20 letech rutinně v humánní medicíně
- ✗ Řešení azoospermie u mužů
- ✗ Injekce jedné spermie do cytoplasmy vajíčka

INTRACYTOPLAZMATICKÁ INJEKCE SPERMIE

ROSI
Round spermatid sperm injection



Pasquariello et al. 2024

Fig. 3. Representative pictures showing cell and nuclear morphology of round spermatids (indicated with red arrows) in the seminiferous tubuli bovine testis. The images were produced using 5 µm-thick histological sections of formalin fixed, paraffin embedded testicular tissues which w hematoxylin and eosin (left side) or 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI, right side). Scale bar = 20 µm. (For interpretation of the references to c legend, the reader is referred to the Web version of this article.)

INTRACYTOPLAZMATICKÁ INJEKCE SPERMIE

Round spermatid sperm injection

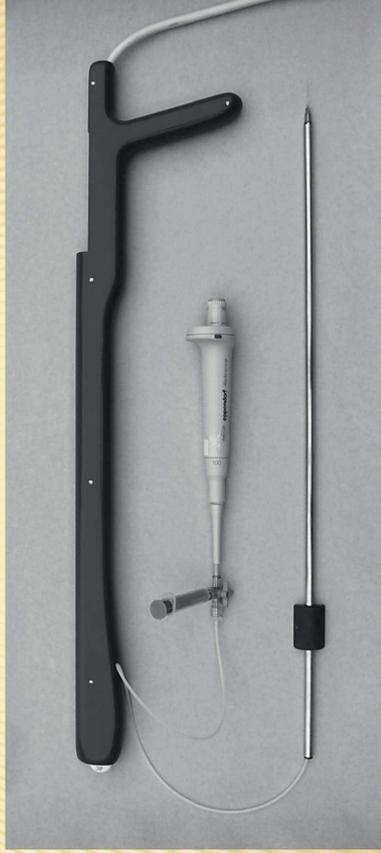
Oválná spermata může oplodnit oocyt
Není schopna aktivně proniknout do oocytu
(schází bičík, akrozom)



Intrafolikulární transfer oocytů

Oocyty injikovány do říjového folikulu
Inseminace
Ovulace, průstup embryí vejcovodem, vývoj
embryí v děloze
Odběr embryí

Intrafolikulární transfer oocytů



Intrafolikulární transfer oocytů



Intrafolikulární transfer oocytů

- * Inseminace provedena v čase IFOT nebo dříve (IFOT zralých nebo nezralých oocytů)
- * Odběr embryí 7 – 8 dnů po IFOT

Bypass pro IVP

Maturation a fertilizace oocytů, vývoj preimplantačních embryí ve vejcovodu a v děloze probíhá v přirozeném prostředí

Výsledky IFOT

Neuspokojivé 10 – 15% embryí z přenesených oocytů

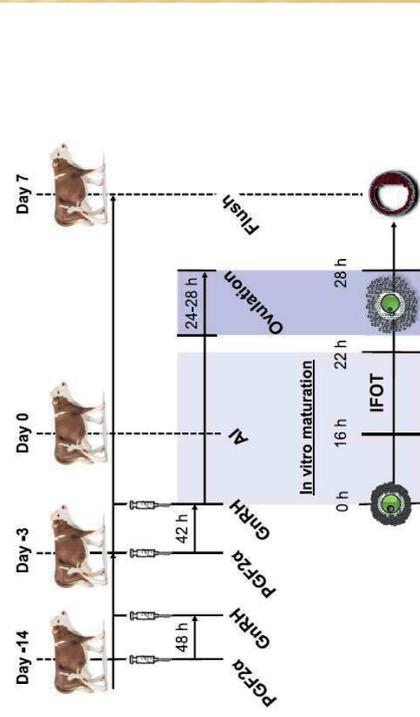


FIG. 1. Time schedule for IFOT. Simmental heifers were subjected to a synchronization protocol by two injections of 500 mg of cloprostenol (Estrumate) 11 days apart, followed by administration of 0.02 mg of GnRH (Receptal) 48 and 42 h thereafter, respectively. Oocyte maturation started at the time of the final GnRH injection, and IFOT was performed 16–22 h thereafter (Day 0), whereas ovulations were expected 24–28 h after final GnRH injection. Seven days later, the uteri of recipients were flushed to recollect IFOT-derived embryos (Day 7).

Intrafolikulární transfer oocytů

aspirator



micromanipulator

transfer device



needle
shortened straw
stainless stick
syringe

Intrafolikulární transfer oocytů

aspirator



micromanipulator

transfer device

stainless steel
piece with
straw

syringe

needle

Intrafolikulární transfer oocytů



Intrafolikulární transfer oocytů



Intrafolikulární transfer oocytů



Intrafolikulární transfer oocytů

locking of the handle/corpus of the injector covering the handle/fixation of the syringe/corpus



control pin of the handlebar

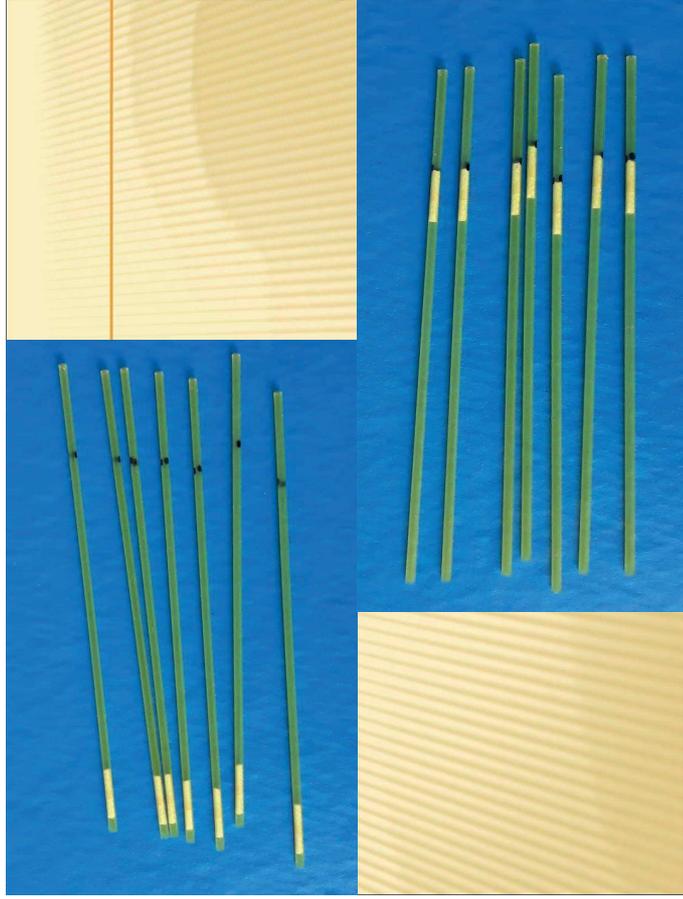
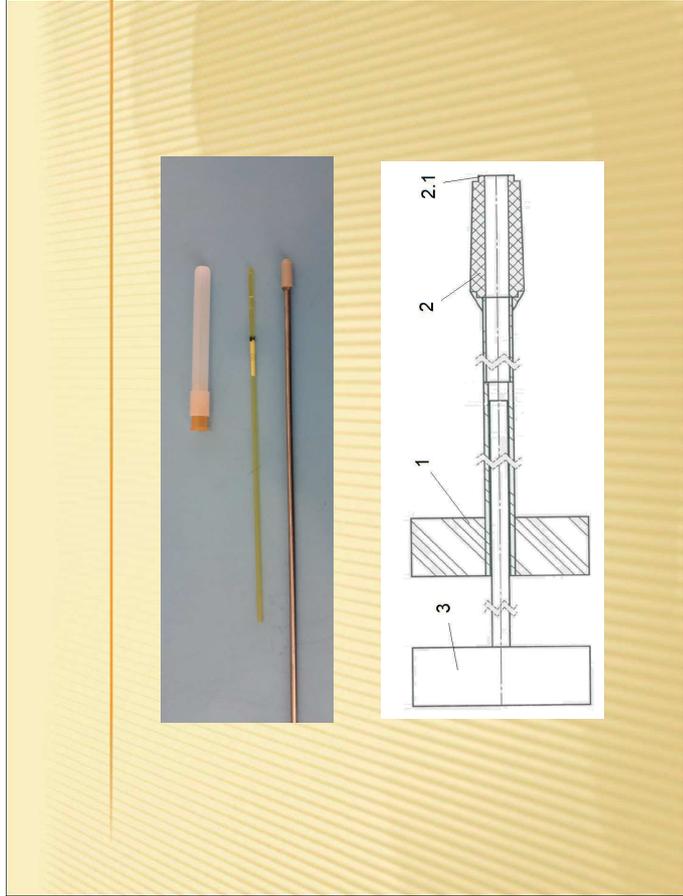


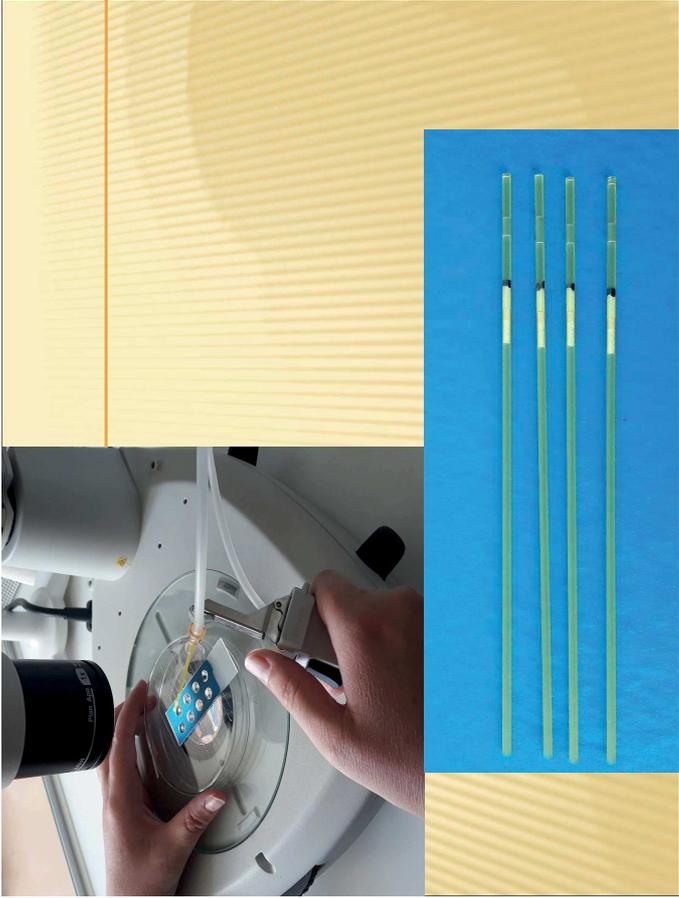
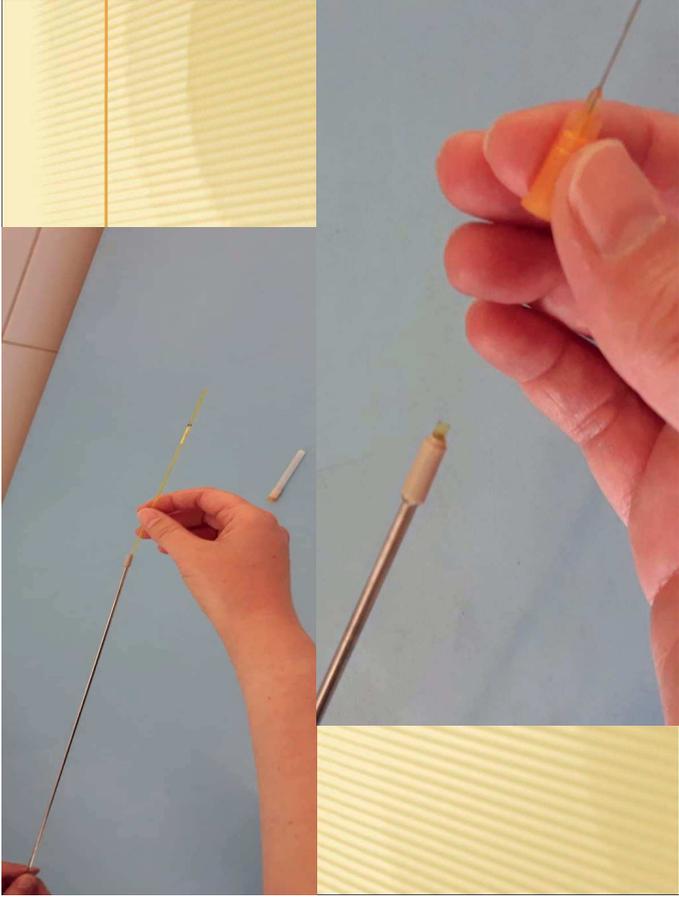
transfer device

Intrafólikulární transfer oocytů



Příčij výsledek projektu NaČeBiVeť





DĚKUJI ZA POZORNOST



Hodnocení semene u skotu

RNDr. Věra Kopecká, Ph.D.

Akreditovaná laboratoř spermatologie a andrologie
VÚVeL Brno

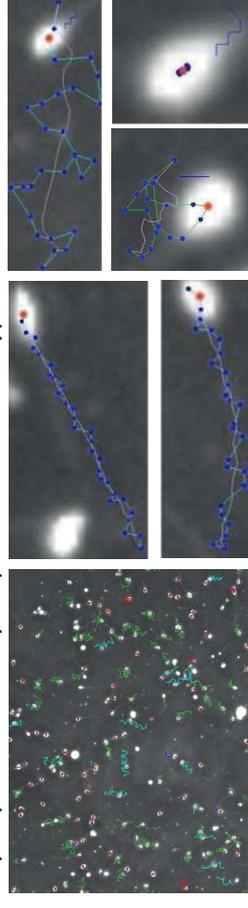
- Základní vyšetření ejakulátu býka je **makroskopické a mikroskopické**.
- Mezi makroskopické parametry patří objem, viskozita, barva, pach a pH, hodnotí se bezprostředně po odběru.
- V číslech: objem **2-10** ml, viskozita **ne moc táhnoucí se**, barva **lehce žlutá**, pach **mléka** a pH je **6,8-6,9**.
- Pod mikroskopické vyšetření se řadí koncentrace, motilita, morfologie, viabilita a další více specializovaná vyšetření.

Koncentrace

- můžeme počítat
 - hemocytometry pomocí melanžéru, mísící pipety na červené krvinky, ředící metodou
 - fotometry podle stupně zákalu
- anebo pomocí počítačem řízeného systému pro analýzu spermií, kterým je např. **CASA (Computer Assisted Sperm Analysis)**

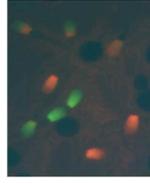
Motilita - pohyb spermií

- Mikroskopicky, **CASA** včetně rychlosti pohybu spermií ($\mu\text{m/s}$)
- Rychlost pohybu spermií je citlivým ukazatelem, který dovoluje časně posoudit nastupující vitální degradaci ejakulátu a proto počítačem podporovaná analýza spermií má velkou vypovídací hodnotu.



Viabilita

- Barvení spermii na živé/mrtvé, vyhodnocení mikroskopicky
 - eosin-nigrosin barvení - světelná mikroskopie
 - SYBR 14+PI, Annexin V, Yo-PRO-1 - fluorescenční mikroskopie nebo průtoková cytometrie

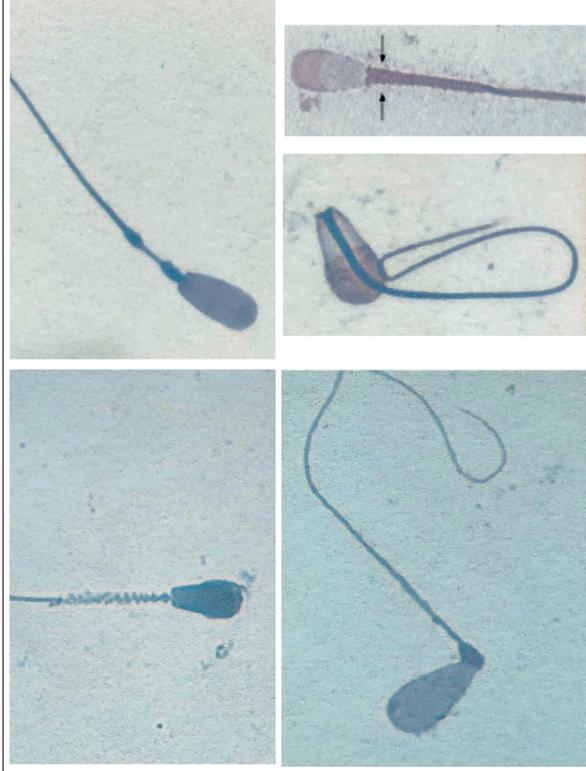
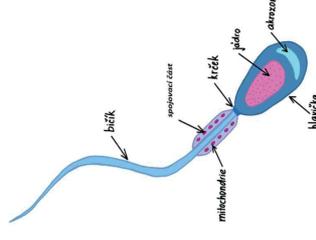


Morfologie a morfometrie

- barvení Farely a podle Hancocka, podle Karrase, podle Čerňovského, podle Papanicolaoua, program DeSMA původně SASMO, LUCIA
- morfologické změny rozdělujeme na:

- vývojové (primární)

- získané (sekundární)



Základní parametry ejakulátu býka

Normospermie

Koncentrace: min 700 000 spermii/mm³

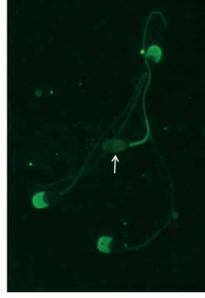
Motilita: min 70%

Viabilita: min 70% živých spermii

Morfologie: min 80% normální morfologie, z toho <10 % primárních změn

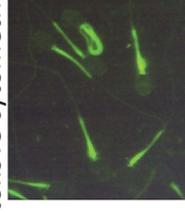
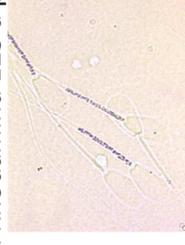
Doplňující metody stanovení kvality spermií

- Stanovení **integrity membrán bíčičku** - **HOS test** (Hypoosmotic Swelling Test), využíváný pro predikci citlivosti k mrazení (semipermeabilita membrán)
- Stanovení **integrity akrozomu** - pomocí vazebné aktivity aglutininu pisum sativum, PSA test



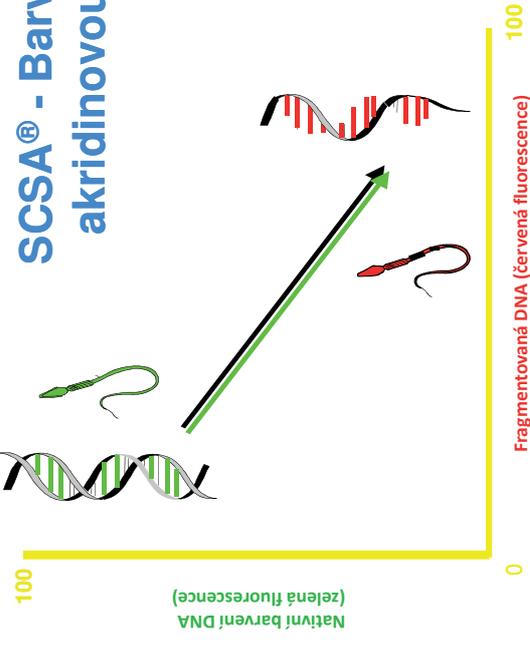
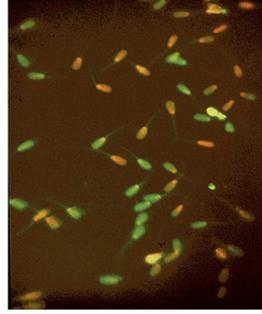
Doplňující metody stanovení kvality spermií

- Stanovení **funkční aktivity mitochondrií**
 - pomocí nitrotrazoliové modři NBT, stanoví se index intenzity reakce
 - použitím Rhodaminu 123 a průtokové cytometrie (fluorescenčně)
- Stanovení **dalších buněk** v ejakulátu (heterologní elementy)



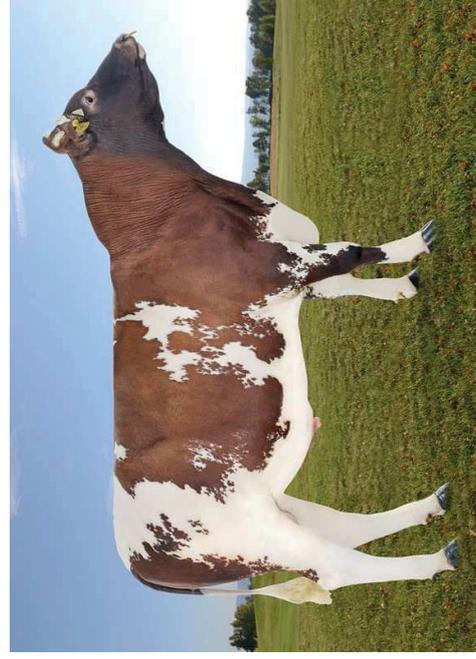
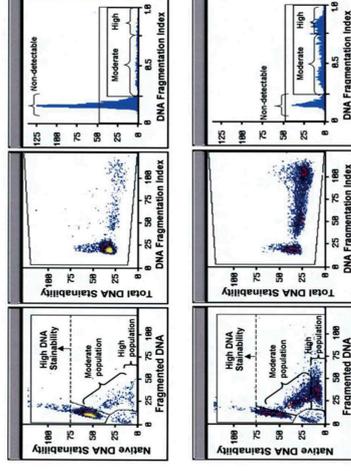
Poruchy genetické výbavy spermií

- Analýza **integrity chromatinu** – poškození DNA působením genotoxických vlivů
- mikroskopicky nebo průtokovou cytometrií
- SCSA (Sperm Chromatin Structure Assay) - porušená DNA v jaderném chromatinu spermií je citlivá k denaturaci, po obarvení AO se měří průtokovou cytometrií intenzita zelené (neporušená DNA) a červené (porušená DNA) fluorescence



SCSA – vyhodnocení

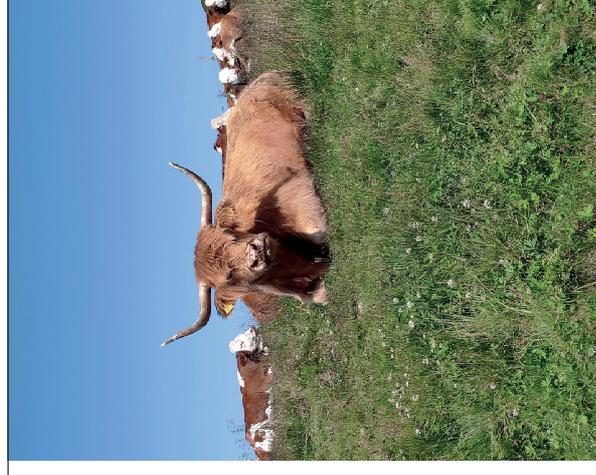
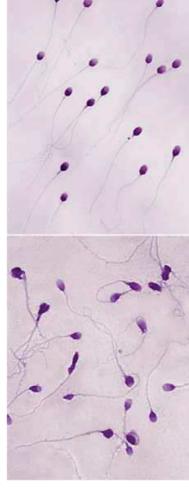
- Stanovení DFI (DNA Fragmentační Index - % spermií s narušeným chromatinem)
- Stanovení % silně barvitelných, nezralých spermií (HDS, High Density Staining)



Použití selekčních metod ke zlepšení kvality vzorku spermií

- **Swim – up** = selekce *motilních spermií* - snížené procento s defektní kondenzací chromatinu
- **Gradientová centrifugace** např. odstraněním krve z ejakulátu se zvýší přežitelnost spermií po kryokonzervaci
- **HBA – Hyaluronan Binding Assay**

- spermie navázané na kyselinu hyaluronovou (hyaluronan) jsou optimálně zralé a funkční pro vazbu k oocytu, mají lepší morfologický obraz



Copyright:

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

Tel.: +420 773 756 631
E-mail: vri@vri.cz

www.vri.cz