



CERTIFIKOVANÁ METODIKA

**Metodika evaluace kvality oocytů a embryí skotu
produkovaných *in vitro* za pomoci světelné
a fluorescenční mikroskopie**

**Mgr. Adéla Horáková
Mgr. Markéta Konečná
Doc. MVDr. Martin Anger, CSc.**

Certifikovaná metodika 152/2024

Metodika evaluace kvality oocytů a embryi skotu produkovaných *in vitro* za pomoci světelné a fluorescenční mikroskopie

Autoři:

Mgr. Adéla Horáková

Mgr. Markéta Konečná

Doc. MVDr. Martin Anger, CSc.

ISBN: 978-80-7672-067-1

Vydal: Výzkumný ústav veterinárního lékařství, v. v. i.



Ministerstvo zemědělství
Těšnov 65/17
110 00 Praha 1

v y d á v á

OSVĚDČENÍ

č. MZE-88309/2024-13141

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

Název metodiky: **Metodika evaluace kvality oocytů a embryi skotu produkovaných in vitro za pomoci světelné a fluorescenční mikroskopie**

Autoři: **Mgr. Adéla Horáková, Mgr. Markéta Konečná, doc. MVDr. Martin Anger, CSc.**

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

Místo vydání: **Brno**

Rok vydání: **2024**

ISBN: **978-80-7672-067-1**

Metodika byla vypracována v rámci řešení projektu Národního Centra Biotechnologií ve Veterinární medicíně – **NaCeBiVet**, registrační č. projektu **TN02000017** pod názvem „Optimalizace in vitro kultivace a mikromanipulace oocytu a embryi skotu“.



V Praze dne 9. 12. 2024

Razítko a podpis zástupce odborného útvaru státní správy

Jméno a funkce zástupce odborného útvaru státní správy:

Ing. Pavel Hakl
ředitel Odboru živočišných komodit
a ochrany zvířat MZe

Metodika evaluace kvality oocytů a embryí skotu produkovaných *in vitro* za pomoci světelné a fluorescenční mikroskopie.

Autoři:

Mgr. Adéla Horáková

Mgr. Markéta Konečná

doc. MVDr. Martin Anger, CSc.

I) Úvod

Chov skotu patří v rámci lidské výživy celosvětově mezi nejdůležitější zdroje bílkovin živočišného původu. Při šlechtění, které si klade za cíl získat geneticky elitní jedince, je možno sledovat trend stále intenzivnějšího uplatňování reprodukčních biotechnologií (Assisted reproductive technology – ART), bez kterých by intenzivní chov dnes již nebyl myslitelný. Od zavedení metody transferu embryí u skotu až do nedávné doby převládala produkce embryí *in vivo* (Multiple Ovulation Embryo Transfer – MOET), přibližně od období let 2014–2016 však začíná převažovat produkce embryí *in vitro* (IVP) ^[1,2].

Produkce embryí *in vitro* zahrnuje získávání oocytů, a to buď ve stádiu zárodečného váčku (Germinal vesicle – GV), nebo v průběhu prvního či druhého meiotického dělení, ideálně ve stádiu metafáze II druhého meiotického dělení, po prodělané meiotické maturaci *in vivo*. Tyto oocyty se získávají z vaječníků po usmrcení zvířat, nebo intravitálně, aspirací z rostoucích či plně vzrostlých folikulů (Ovum pick up – OPU) ^[3]. Pokud oocyty ještě nedokončily meiotické dělení, a nenachází se ve stádiu metafáze II druhé meiózy, nejsou připraveny k fertilizaci ihned

a je nutné je nechat dozrát v podmínkách *in vitro*. U dozrálých oocytů ve stádiu metafáze II následuje *in vitro* fertilizace, kterou je výhodné provést sexovanými inseminacími dávkami a připravit tak embrya požadovaného pohlaví ^[4]. Následuje vývoj embryí do stádií vhodných k zamražení a následnému přenosu, což může být i morula, ale nejčastěji se používá blastocysta. Není bez zajímavosti, že u lidí bylo zjištěno, že přenos mladších vývojových stádií embryí má některé výhody a nenese rizika zkracování telomer u buněk imunitního systému ^[5]. Samotný vývoj embryí *in vitro* je i přes veškerý pokrok v této oblasti stále suboptimální. Dá se říci, že jen méně než polovina embryí v podmínkách *in vitro* dosáhne požadovaného stádia vývoje, což je charakteristické nejen pro embrya skotu, ale i pro embrya člověka. Příčin zastavení vývoje je více, početně však převažují problémy s chybným dělením chromozomů v blastomerách vyvíjejícího se embrya. Problémy s vývojem oocytů a embryí v podmínkách *in vitro* brání v současnosti širšímu nasazení reprodukčních biotechnologií, a pokud se nepodaří produkci optimalizovat, bude zcela jistě v budoucnu komplikovat i nasazení takzvaného „šlechtění *in vitro*“, které předpokládá zavedení kmenových buněk a genetických manipulací ve šlechtění skotu ^[6]. Problém IVP ovšem není omezen jen na malé počty vyvíjejících se embryí, ale jde i o špatný vývoj embryí po rozmražení a transferu ^[7].

Další komplikace představují změny, které se objevují u *in vitro* produkováných embryí, například změny na úrovni epigenetické informace ^[8]. Možnosti, jak produkci IVP embryí zlepšit, spočívají například v další optimalizaci kultivačních postupů, ať už za pomoci úpravy kultivačních médií růstovými faktory, hormony nebo změnou poměrů aminokyselin atd ^[1,9]. Tento vývoj je velice slibný a použití řízeného uvolňování biologicky aktivních látek je jedním z aktivně rozvíjených směrů výzkumu. Pro analýzu kvality embryí, ať už z hlediska jejich vhodnosti pro embryotransfer, či z hlediska optimalizace kultivačních postupů, či zavádění nových metodik, je důležité zvládnout metodické postupy hodnocení. Toto představuje velice komplexní problém, jehož řešení závisí na následném osudu embryí či zárodečných buněk.

Tato metodika se zaměřuje na použití metod moderní mikroskopie, které prodělaly v posledních desetiletích bouřlivý vývoj. Současně pokroky v chemii fluorescenčních značek v posledních letech umožnily významně rozšířit repertoár jejich možného využití u živých embryí ^[10]. Aktuálně je tedy přístupná celá řada technik a postupů, které umožňují komplexní analýzu fixovaných i živých oocytů a embryí a získání komplexní informace o jejich kvalitě. Tyto techniky jsou používány především ve výzkumu a jen málo z nich je uplatňováno v praxi. Cílem této metodiky je připravit několik postupů, které jsou uplatnitelné spíše prakticky, a které

mohou být klíčové při přípravě nových postupů k získávání a také k evaluaci kvality IVP embryí. Tyto techniky mohou být tedy použity ke zvýšení a zkvalitnění produkce embryí a ke zefektivnění postupů reprodukčních biotechnologií.

II) Cíle metodiky

Cílem metodiky je inovovat postupy vyžívající moderních mikroskopických metod k hodnocení kvality oocytů a embryí skotu. Použití těchto metod umožňuje získat komplexní informaci o kvalitě oocytů a embryí, a o jejich vhodnosti pro další aplikace. Další možností využití je vyhodnocení změn kultivačních postupů a dopadu těchto změn na zárodečné buňky a embrya. Z toho důvodu byly zařazeny metody jak pro hodnocení fixovaných, tak i živých oocytů a embryí. Metodika se zaměřuje zejména na následující aspekty kvality oocytů a embryí:

- hodnocení kvality zrání oocytů *in vitro*
- hodnocení kvality buněk získaných aspirací z folikulů
- hodnocení vývoje a kvality embryí

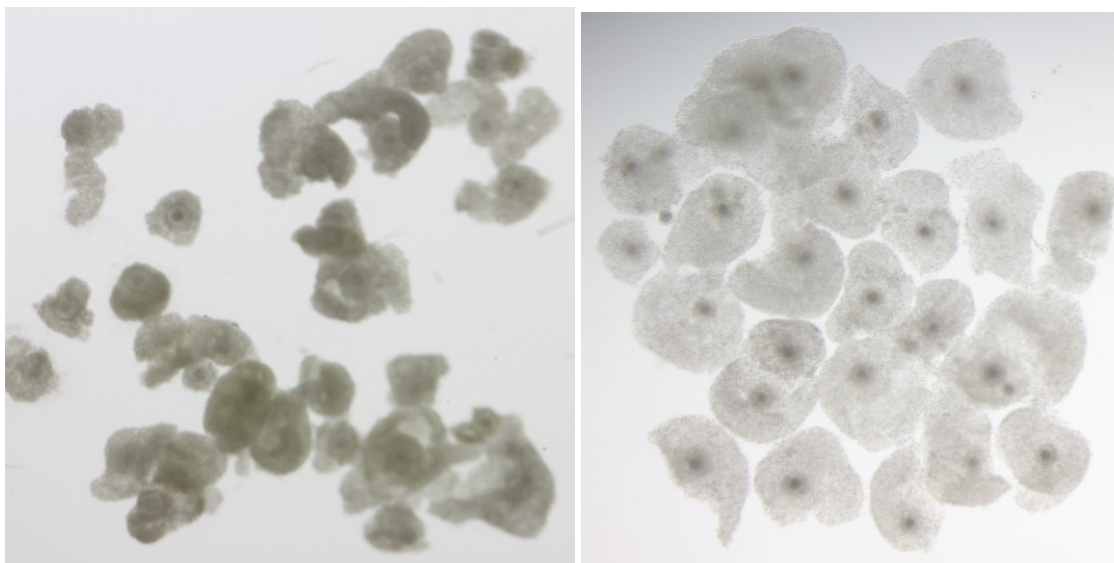
Metodika zahrnuje postupy pro přípravu vzorků, pro provedení mikroskopického snímání a základní metody vyhodnocení pro účely analýzy procesu *in vitro* produkce embryí.

III) Vlastní popis metodiky

A) Vyhodnocení meiotického zrání u živých a fixovaných buněk

Oocyty ve fázi GV získané z jatečných ovarii, či oocyty v průběhu meiózy získané aspirací z folikulů, jsou propláchnuty ve zracím médiu (10ml média založeného na TCM-199 obsahuje dále 1 ml fetálního bovinního séra, 20 IU FSH, 2,25 mg pyruvátu sodného, 4,95 mg laktátu vápenatého, 0.19 mg alanin glutamátu, 0.45 mg gentamycinu), které je předem inkubováno při teplotě 38,5 °C, vysoké vzdušné vlhkosti a v atmosféře s 5 % CO₂. K maturaci jsou umístěny do čtyřjamkových kultivačních misek (Nunc) naplněných zracím médiem, přičemž počet buněk v jedné jamce je do 20 oocytů. Kultivace probíhá po dobu 24 hodin, během které by měly oocyty dosáhnout metafáze II, kdy jsou vhodné k oplození. Během kultivace je žádoucí zasahovat do procesu co nejméně a nevyjímat příliš často oocyty z inkubátoru. Vyhodnocení zrání lze provést neinvazivně, a to vyhodnocením expanze kumulárních buněk^[11]. Pro toto běžně používané vyhodnocení buněk je kultivační

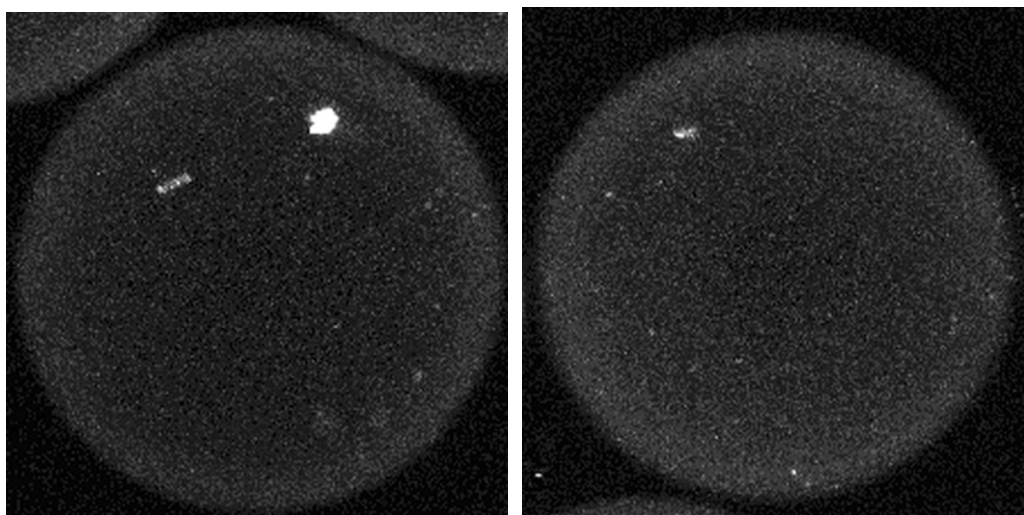
miska s oocyty přemístěna na binokulární mikroskop. Skupina oocytů je vyfocena v malém zvětšení a oocyty roztříděny podle stupně expanze kumulu k dalšímu použití (obr. 1).



Obrázek 1: Expanze kumulárních buněk během meiotické maturace oocytů

Obrázek nalevo ukazuje oocyty těsně po izolaci z ovarií, buňky jsou pokryté několika vrstvami kumulárních buněk. Obrázek napravo ukazuje tyto oocyty po 24hodinové kultivaci ve zracím médiu, kdy každý oocyt je obklopen mnohačetnou vrstvou buněk.

Oocyty s plně rozvinutým kumulem jsou pak využity dále k fertilizaci či zamraženy. Někdy ovšem není expanze kumulárních buněk synchronizována s dynamikou zrání oocyty, a i oocyt s plně expandovaným kumulem není z hlediska buněčného cyklu v metafázi druhého meiotického dělení. Tyto poruchy je možno odhalit intravitálním barvením, kdy je do maturačního média přidána fluorescenční značka DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) v koncentraci 10 µg/ml zviditelňující DNA (obr. 2).

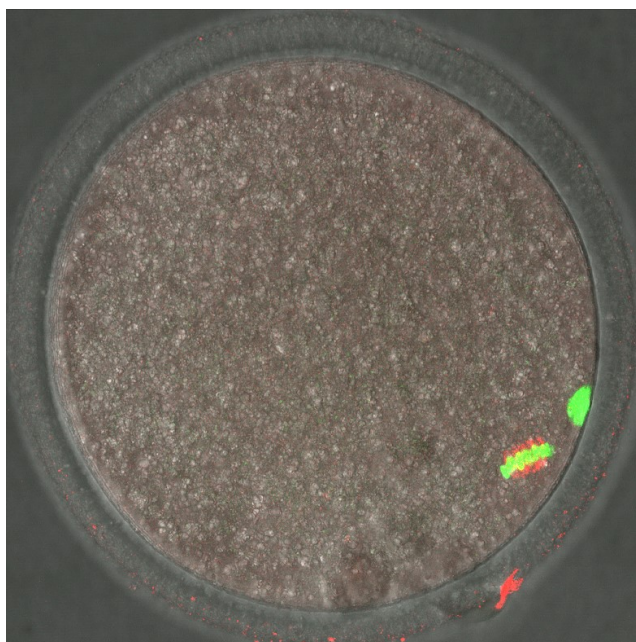


Obrázek 2: Vizualizace DNA v živých oocytech za pomoci Hoechst značení

Oocyty po proběhlé maturaci v délce 22 h byly inkubovány 1 hodinu ve zracím médiu s přídavkem 10 µg/ml Hoechst 34580 a následně skenovány na konfokálním mikroskopu Leica SP5. Excitace je zajištěna laserem 405 nm, každý oocyt je skenován v 59 řezech v rovině z. Výsledný obrázek představuje maximální projekci v rovině z. Oocyt vlevo vykazuje zřetelně dvě chromozomální masy, z nichž první náleží DNA na dělicímu vřeténku v metafázi II a druhá je v pólovém tělísku. Obrázek vpravo ukazuje oocyt s jednou chromozomální masou, buňka se tudíž nachází ve stádiu meiózy I.

Další technikou, která najde uplatnění spíše při zavádění nových postupů pro získávání a kultivace oocytů, je fixace a barvení oocytů za pomoci fluorescenčních značek či protilátek. Takto vyhodnocené buňky se samozřejmě nedají využít k další kultivaci, avšak je tak možné získat téměř úplnou informaci o jejich kvalitě. Postup fixace a barvení buněk je následující: z oocytů po kultivaci jsou odstraněny kumulární buňky vortexováním ve skleněné zkumavce v cca 1ml zracího média. Následně je odstraněna i zona pellucida (ZP), a to za pomoci Tyrodovy kyseliny (Merck). Pro odstranění ZP připravíme 60 mm Petriho misku se 3 kapkami (cca 100 µL) maturačního média a mezi první a druhou kapku umístíme stejně velkou kapku Tyrodovy kyseliny. Oocyty z kultivační misky přeneseme do první kapky média a následně do kapky s Tyrodovou kyselinou. Oocyty průběžně pozorujeme a jakmile se zona pellucida rozpustí, okamžitě je přemístíme do následující kapky s médiem, krátce propláchneme a přeneseme do poslední kapky s médiem. Následuje fixace ve 4% paraformaldehydu rozpuštěném v horkém PBS. Fixace probíhá ve skleněné misce a trvá 20

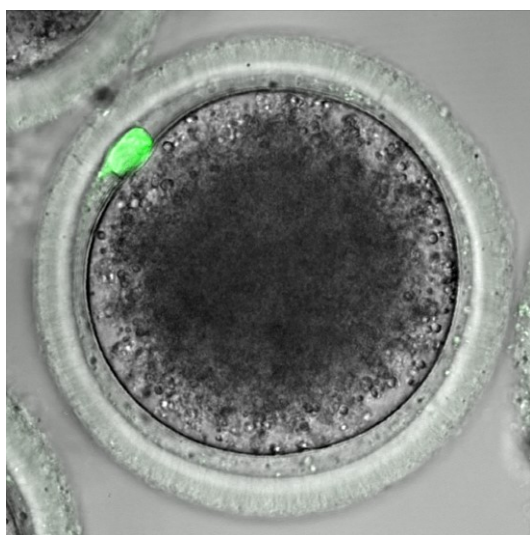
minut až hodinu. Následuje permeabilizace buněk v 0.5% Tritonu v PBS po dobu 15 minut a proplach v blokovacím roztoku 0,1% bovinního sérového albuminu a 0.01% Tween-20 v PBS. Poté jsou oocyty inkubovány s primární a sekundární protilátkou v blokovacím roztoku po dobu jedné hodiny, a to v pokojové teplotě nebo v chladničce po dobu 8 hodin. Po každé protilátce následuje proplach ve 4 kapkách blokovacího roztoku. Následně je oocyt přenesen na podložní sklíčko do kapky montovacího média Vectashield obsahující DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) (Merck) a překryt 1,5 N borosilikátovým krycím sklem. Následuje skenování na konfokálním mikroskopu. K excitaci se používají vlnové délky odpovídající fluorescenčním značkám na použitých sekundárních protilátkách, nejčastěji 405nm, 488nm a 561nm. K detekci jsou použity konfokální detektory. Vzhledem k tloušťce preparátu je nutné skenovat ve více konfokálních řezech v rovině z. Vizualizace získaných dat je pak možná za pomoci software ovládající konfokální mikroskop, případně za pomoci volně šířených softwarových balíčků (ImageJ, FIJI - <https://imagej.net>), nebo za pomoci komerčního software (Imaris - <https://imagej.net>). V dnešní době není ani nutné uvedené vybavení vlastnit, je možno využít služeb specializovaných laboratoří (<https://cellim.ceitec.cz>, <https://www.img.cas.cz/group/light-microscopy/>) (obr. 3).



Obrázek 3: Analýza zrání – vizualizace chromozomů a dělicího vřeténka

Oocyt získaný aspirací z folikulu je po fixaci zpracován pro barvení chromozomů (DAPI-zeleně) a dělicího vřeténka (protilátka proti acetylovanému tubulinu, červeně). Přítomnost dělicího vřeténka uvnitř oocyty a pólóvého tělíska naznačuje dokončené zrání do meiózy II.

Pro vyhodnocení zrání lze s výhodou použít i značení tubulinu v živých oocytech za pomoci sondy označené SirTubulin (Spirochrome). Oocyty jsou po denudaci přímo ve zracím médiu značeny touto sondou v koncentraci 2 000x, a to po dobu 1 až 2 hodin. Využíváme vyšší afinity značky pro struktury pólóvého tělíska, to nám umožní vyhodnotit počet oocytů ve stádiu metafáze II (obr. 4).



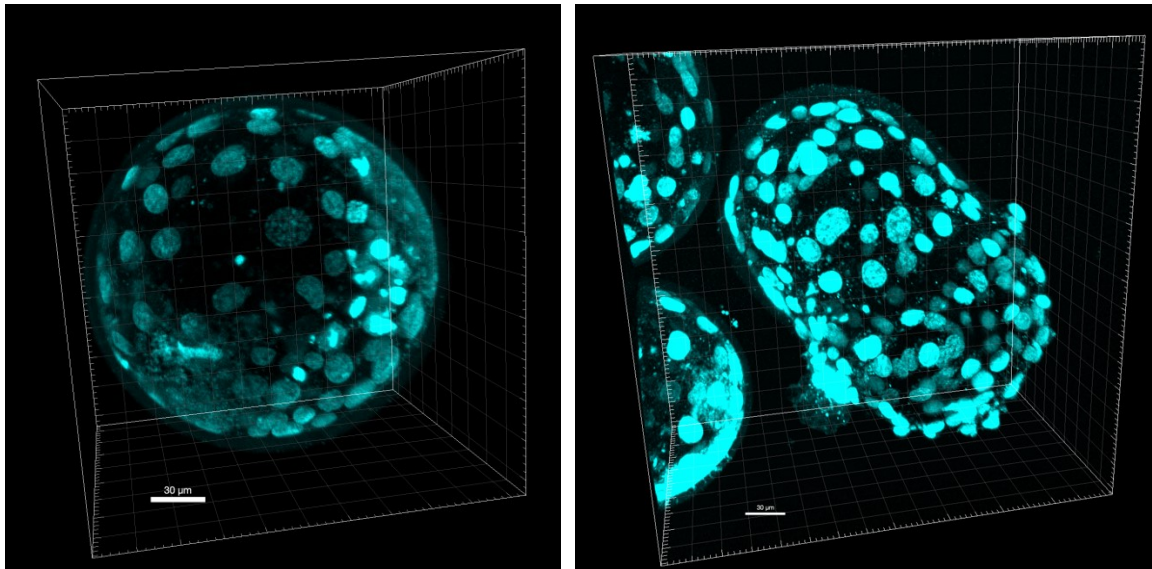
Obrázek 4: Vyhodnocení zrání za pomoci sondy pro tubulin, která prochází přes membrány. Oocyty jsou denudovány za pomoci vortexu a následně jsou značeny sondou SirTubulin (zeleně) přímo ve zracím médiu. Oocyty jsou po odmytí barvy použitelné k dalším účelům.

B) Vyhodnocení vývoje embryí

Vývoj embryí od oplození do stádia vhodného pro zamražení či transfer je doposud u skotu či člověka suboptimální. Z toho důvodu je výhodné selektovat, ať už pro uchování, nebo pro zamýšlený transfer, pouze embrya, která mají dobrý vývojový potenciál. Ten je u embryí člověka i skotu dán zejména počtem buněk a jejich uspořádáním v embryu ^[12,13]. Zobrazovací metody vizualizující buňky nebo jejich jádra ve vyvíjejícím se embryu umožní

stanovit, jestli vývoj probíhal normálně, spočítat počet buněk, a určit, zda jejich konfigurace v embryu je úměrná vývojovému stádiu. Existuje celá řada fluorescenčních značek s afinitou k DNA, které se dají použít k těmto účelům. Jejich použití pro analýzu živých embryí bylo umožněno značným pokrokem v mikroskopii za poslední desetiletí a zároveň vývojem nových fluorescenčních sond ^[14].

V této metodice představujeme použití DAPI pro analýzu kvality živých embryí. Tento postup umožňuje analyzovat především počet buněk, ale i jejich konfiguraci. Například v určitém vývojovém stádiu je možno pozorovat, jestli je správně vytvořen jak trofoblast, tak i embryoblast. Pro tento postup jsou embrya po fertilizaci kultivována v kultivačním médiu (10ml média založeného obsahuje dále 0,5 ml fetálního bovinního séra, dále esenciální a neesenciální aminokyseliny, 2,5 µL EGF, 60 mg chloridu sodného, 2,14 mg chloridu draselného, 19,95 mg cydlogenuhličitanu sodného, 5,22 mg caktátu vápenatého, 0,418 mg cyruvátu sodného 28,13 mg clanin glutamátu 0,5 mg gentamycinu). Pro analýzu jsou embrya požadovaného vývojového stádia přenesena do kultivačního média obsahující DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) v koncentraci 10 µg/ml. Inkubace s DAPI probíhá pouze 10 minut. Poté jsou embrya přeneseny do 5µl kapky média pokryté minerálním olejem na zobrazovací misce se dnem z 1,5 N borosilikátového skla (Mattek <https://www.mattek.com/store-category/35mm-dishes/>). Excitace DAPI na konfokálním mikroskopu je následně zajištěna laserem o vlnové délce 405 nm a embrya jsou skenována v rozsahu svého objemu 20-50 řezy v rovině z. Následně jsou embrya rekonstruována ve 3D za pomoci software mikroskopu, volně dostupných softwarových balíčků (FIJI) nebo za pomoci software Imaris (obr.5).



Obrázek 5: Vizualizace jader buněk trofoblastu a embryoblastu v živém embryu skotu. Pro vizualizaci jader bylo použito značení za pomoci DAPI (modře). Výsledný obrázek je vytvořen rekonstrukcí ve 3D za pomoci software Imaris. Vlevo je znázorněna plně expandovaná blastocysta se skupinou intenzivněji zbarvených jader epiblastu. Vpravo je znázorněna blastocysta opouštějící zonu pellucidu (hatching)

IV) Srovnání novosti postupů

Metody světelné mikroskopie jsou využívány rutinně v průběhu procesu přípravy embryí *in vitro*. Jsou ovšem omezeny zejména na použití preparativních stereomikroskopů, které slouží k izolaci a mikromanipulaci oocytů a embryí. V této metodice stavíme na moderních poznatcích světelné mikroskopie a popisujeme metody, které slouží k hlubší analýze kvality meiotického zrání oocytů a vývoje embryí. Některé z popsaných postupů se dají s výhodou také použít na živé buňky a embrya, které lze pak využít pro další účely.

Příprava IVP embryí je páteří reprodukčních biotechnologií současnosti, které jsou dnes základem úspěšného šlechtění stáda. Popsané mikroskopické přístupy přispějí ke zpřesňování metod, které se využívají ke kultivaci a přípravě embryí *in vitro* a umožní lepší selekci embryí pro další aplikace.

V) Popis uplatnění certifikované metodiky

Tato metodika je uplatnitelná při přípravě oocytů a embryí *in vitro*. Tyto postupy jsou stále málo účinné a pouze méně než polovina embryí dosáhne požadovaného vývojové stupně. Metody přesnější charakterizace zárodečných buněk, embryí a jejich kvality přispěje k vývoji metod, které umožní optimalizovat produkci embryí *in vitro*. Metoda je jednoduše adaptovatelná pro jiné druhy hospodářských a zájmových zvířat.

VI) Ekonomické aspekty

Metoda bude uplatnitelná zejména k vývoji nových metod produkce oocytů a embryí *in vitro*, k analýze nových postupů mražení a vitrifikace, a ke kontrole embryí před transferem. Tyto inovace budou zařazeny do praktické realizace v postupech asistované reprodukce (transfer embryí *in vivo*, IVP) a povedou ke zlepšení jejich výsledků, zejména k zisku vyššího počtu kvalitních embryí. Tím bude dosaženo i lepších ekonomických výsledků, protože náklady na jeden přenosový den v praxi jsou v podstatě fixní a při vyšším počtu získaných embryí se náklad na jednotku produkce výrazně snižuje. Dalším benefitem bude vyšší přežívání embryí po přenosech v důsledku jejich přesnější selekce. Přesná kalkulace v absolutních číslech není možná, lze odhadovat úsporu nákladů ve výši 10-15 %.

VII) Seznam použité literatury

1. Ferré, L. B., Kjelland, M. E., Strøbech, L. B., Hyttel, P., Mermillod, P. & Ross, P. J. Review: Recent advances in bovine *in vitro* embryo production: reproductive biotechnology history and methods. *Animal* **14**, 991-1004 (2020).
2. Viana, J. 2018 Statistics of embryo production and transfer in domestic farm animals. *Embryo Technology Newsletter* (2019).
3. Galli, C., Crotti, G., Notari, C., Turini, P., Duchi, R. & Lazzari, G. Embryo production by ovum pick up from live donors. *Theriogenology* **55**, 1341-1357 (2001).
4. Mikkola, M., Desmet, K. L. J., Kommisrud, E. & Riegler, M. A. Recent advancements to increase success in assisted reproductive technologies in cattle. *Anim Reprod* **21**, e20240031 (2024).
5. Wang, C. et al. Leukocyte telomere length in children born following blastocyst-stage embryo transfer. *Nat Med* **28**, 2646-2653 (2022).
6. Goszczynski, D. E. & Cheng, H. In vitro breeding: application of embryonic stem cells to animal production. *Biology of ...* (2019).

7. Hansen, P. J. The incompletely fulfilled promise of embryo transfer in cattle-why aren't pregnancy rates greater and what can we do about it. *J Anim Sci* **98**, skaa288 (2020).
8. Urrego, R., Rodriguez-Osorio, N. & Niemann, H. Epigenetic disorders and altered gene expression after use of Assisted Reproductive Technologies in domestic cattle. *Epigenetics* **9**, 803-815 (2014).
9. Hansen, P. J. Review: Some challenges and unrealized opportunities toward widespread use of the in vitro-produced embryo in cattle production. *Animal* **17 Suppl 1**, 100745 (2023).
10. Ono, Y. et al. Shape of the first mitotic spindles impacts multinucleation in human embryos. *Nat Commun* **15**, 5381 (2024).
11. Turathum, B., Gao, E. M. & Chian, R. C. The Function of Cumulus Cells in Oocyte Growth and Maturation and in Subsequent Ovulation and Fertilization. *Cells* **10**, 2292 (2021).
12. Kong, X. et al. The Relationship between Cell Number, Division Behavior and Developmental Potential of Cleavage Stage Human Embryos: A Time-Lapse Study. *PLoS One* **11**, e0153697 (2016).
13. Ross, P. J. et al. Blastocyst Cell Number and Allocation Affect the Developmental Potential and Transcriptome of Bovine Somatic Cell Nuclear Transfer Embryos. *Stem Cells Dev* **32**, 515-523 (2023).
14. Fuchs, H., Jahn, K., Hu, X., Meister, R., Binter, M. & Framme, C. Breaking a Dogma: High-Throughput Live-Cell Imaging in Real-Time with Hoechst 33342. *Adv Healthc Mater* **12**, e2300230 (2023).

VIII) Seznam publikací předcházejících metodice

Anger, M., Čech, S: Aktuální problematika reprodukčních biotechnologií u skotu. *Náš chov* (2023).

IX) Dedikace

Metodika vznikla na základě poznatků získaných v rámci řešení projektu NaCeBiVet, registrační číslo projektu TN02000017.

X) Jména oponentů

Ing. Jan Vodička, PhD.

Ministerstvo zemědělství

odbor zemědělských komodit a ochrany zvířat

Těšnov 65/17, 110 00 Praha

prof. Ing. Ladislav Máchal, DrSc.

Mendelova univerzita v Brně

Agronomická fakulta

Zemědělská 1665/1, 613 00 Brno

XI) Podíl práce

Mgr. Adéla Horáková – 50 %

Mgr. Markéta Konečná – 25 %

doc. MVDr. Martin Anger, CSc. – 25 %



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