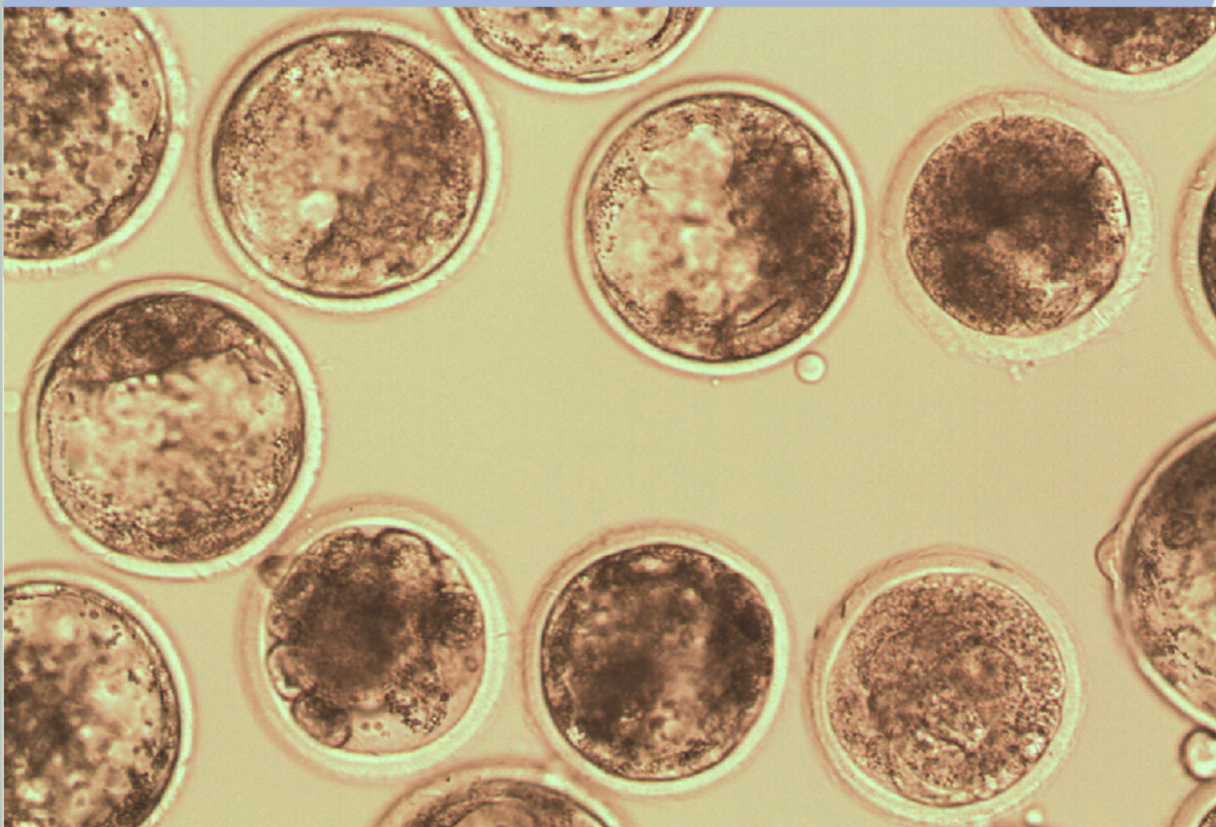


Tereza Ranná
Markéta Kohoutová
Kristýna Vacková
Jana Rychtářová

IN VITRO DOKULTIVACE EMBRYÍ SKOTU PŘI POUŽITÍ SYSTÉMU MOET



CERTIFIKOVANÁ METODIKA

In vitro dokultivace embryí skotu při použití systému MOET

Autoři:

Ing. Tereza Ranná

Ing. Markéta Kohoutová

Mgr. Kristýna Vacková

Ing. Jana Rychtářová, Ph.D.

Oponenti:

doc. Ing. Jan Beran, Ph.D.

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích

Ing. Zdeňka Majzlíková

Česká plemenářská inspekce, Praha

Metodika je výsledkem řešení výzkumného projektu VÚŽV, v. v. i.
TN02000017 s názvem: Národní Centrum Biotechnologií ve Veterinární Medicíně – NaCeBiVet.

Předkladatel: Výzkumný ústav živočišné výroby, v.v.i.

se sídlem Přátelství 815, 104 00 Praha Uhřetěves

zastoupený **Dr. Ing. Pavlem Čermákem**, ředitelem

Tel.: 00420 267 009 511 (ústředna)

Fax: 00420 267 710 779

www: <http://www.vuzv.cz>

e-mail: vuzv@vuzv.cz

Zástupcem autorského týmu je Ing. Tereza Ranná



Česká plemenářská inspekce

Slezská 100/7, Praha 2, 120 00

v y d á v á

OSVĚDČENÍ

9457/2024-ČPI

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: **In vitro dokultivace embryí skotu při použití systému MOET**

Autor / autoři: Ing. Tereza Ranná, Ing. Markéta Kohoutová, Mgr. Kristýna Vacková, Ing. Jana Rychtářová, Ph.D.

Název organizace/cí: Výzkumný ústav živočišné výroby, v.v.i., Přátelství 815, 104 00 Praha Uhřetěves

Místo vydání: **Praha**

Rok vydání: **2024**

Metodika je výsledkem řešení projektu VÚŽV, v.v.i. TN02000017 s názvem: Národní Centrum Biotechnologií ve veterinární medicíně – NaCeBiVet.

Jméno zástupce odborného útvaru státní správy:
Funkce zástupce odborného útvaru státní správy:

Ing. Zdenka Majzlíková
ředitelka

V Praze dne 16. 12. 2024

Ing. Zdenka Majzlíková

Podpsal Ing. Zdenka Majzlíková
DN: o=ing. Zdenka Majzlíková,
ou=ČZ, ou=Česká plemenářská
inspekce, ou=45,
email=majzlíkovaz@cpinsp.cz
Datum: 2024.12.16 07:47:51 +01'00'

Podpis/elektronický podpis zástupce
odborného útvaru státní správy

Souhlas ředitele Odboru vědy, výzkumu a vzdělávání MZe:

V dne

Mgr. Jan Radoš

Digitálně podepsal
Mgr. Jan Radoš
Datum: 2024.12.18
09:42:17 +01'00'

Podpis/elektronický podpis
ředitele/ředitelky Odboru vědy, výzkumu
a vzdělávání

Obsah

1. Cíl metodiky	4
2. Úvod	4
3. Vlastní popis metodiky	5
3.1. Hormonální stimulace dárkyň	5
3.2. Inseminace a výplach dárkyň.....	5
3.3. Hodnocení a třídění embryí.....	5
3.4. Převoz embryí.....	6
3.5. Dokultivace embryí.....	6
3.6. Zhodnocení dokultivace	6
3.7. Kryokonzervace embryí	6
3.8. Přenos do příjemkyň.....	7
4. Srovnání „novosti postupů“	8
5. Popis uplatnění metodiky	8
6. Výsledky	9
7. Ekonomické aspekty	11
9. Seznam použitých zkratk	12
10. Seznam použité související literatury	12
11. Seznam publikací, které předcházely metodice a byly publikovány.	12

1. Cíl metodiky

Cílem metodiky bylo zvýšit počet přenosuschopných embryí získaných pomocí metody asistované reprodukce MOET (multiple ovulation and embryo transfer) a tím zvýšit produkci a využitelnost geneticky cenných jedinců skotu. Metodika popisuje *in vitro* dokultivaci embryí, která nejsou po výplachu dárkyň vhodná k okamžitému přenosu do příjemkyň či k dlouhodobému uchování (kryokonzervaci).

2. Úvod

Systém MOET je v současné době hojně používaný způsob asistované reprodukce, díky kterému lze efektivněji rozšiřovat vybrané genetické informace jedinců s vysokou plemennou hodnotou. A to hlavně díky tomu, že je možné v kratším časovém období vytvořit více embryí a tím zvýšit porodnost, než by tomu bylo u přirozeného způsobu plemenitby (McDaniel & Cassel, 1981). Při této metodě jsou plemenice s vysokou plemennou hodnotou (dárkyně) hormonálně stimulované pro superovulaci a tím dochází k dozrání více oocytů v průběhu jedné ovulace. Následně jsou dárkyně inseminovány a díky superovulaci dochází ke vzniku více embryí. Šestý den po inseminaci je proveden výplach embryí z obou děložních rohů dárkyně, čímž se získají vzniklá embrya. Tato embrya jsou následně uchována pomocí kryokonzervace, nebo ihned přenesena do náhradních (hormonálně nastimulovaných) samic. Tyto samice (příjemkyně) již nemusí splňovat vhodná genetická kritéria, protože zde dochází pouze k vývoji plodu a následnému porodu mláďete (Smith, 1988). Ačkoliv je systém MOET běžně využívaná metoda, je pro něj limitující, že se využívá pouze část výplachem získaných embryí, tj. těch, která jsou vhodná k okamžitému přenosu či uchování. Zbylá embrya, která nemají dostatečnou kvalitu nebo nejsou dosud ve vhodné embryonální zralosti, jsou znehodnocena. Tato metodika přináší možnost využití těchto „nezralých“ embryí. Metodika popisuje *in vitro* dokultivaci vypláchnutých nezralých embryí do požadované fáze vývoje kompaktní moruly nebo blastocysty. Takto dozralá embrya je možné následně využít k produkci potomstva.

3. Vlastní popis metodiky

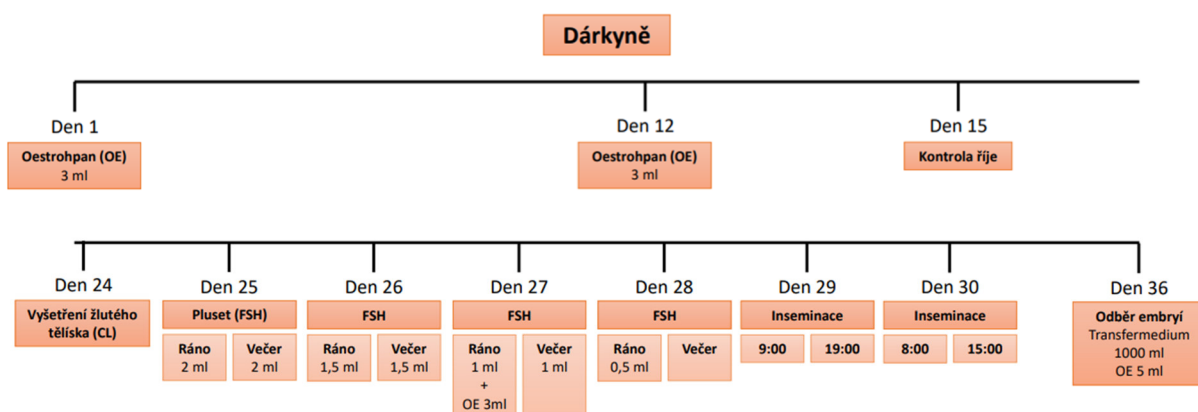
3.1. Hormonální stimulace dárkyň

Pro získání většího počtu embryí je nutné dárkyně hormonálně stimulovat. Dárkyním je prvotně provedeno sonografické vyšetření vaječníků. V případě nálezu žlutého tělíska je první den aplikována dávka 3 ml Oestrophanu (OE). Dvanáctý den dojde k opětovné aplikaci 3 ml OE. Patnáctý den je provedena kontrola říje. Pokud dárkyně na hormonální stimulaci zareaguje a dostaví se říje, jsou ve stejný den příjemkyním aplikovány 3 ml OE. Pokud jsou dárkyně dobře stimulovány a synchronizovány, dvacátý čtvrtý den lze na sonografickém vyšetření pozorovat žluté tělísko a následující den se může pokračovat ve stimulaci pomocí folikulostimulačního hormonu (FSH) a luteinizačního hormonu (LH) injekční aplikací přípravku Pluset (50 IU FSH + 50 IU LH/1 ml; Tabulka 1). Čtvrtý den od začátku podávání Plusetu dochází k prvnímu dni inseminace.

3.2. Inseminace a výplach dárkyň

Inseminace probíhá ráno a večer. Následující den se dárkyně reinseminují ráno a odpoledne. Pokud inseminace proběhla úspěšně, třicátý šestý den, tj. šestý den po inseminaci, jsou z dárkyň pomocí transferového média vypláchnutá embrya a následně se podá 5 ml OE pro nastartování nového říjového cyklu. Po výplachu embryí dochází k inovativnímu přístupu rozšíření úspěšnosti embryotransferu, což je předmětem této metodiky, který je popsán v následujících odstavcích.

Tabulka 1, časové schéma hormonální stimulace dárkyň pro systém MOET a odběr embryí.



3.3. Hodnocení a třídění embryí

Z materiálu získaného výplachem dárkyň jsou vybrána životaschopná a oplozená embrya, která se následně mikroskopicky zhodnotí podle jejich vývojové fáze a kvalitativních kritérií. Mezi klíčové znaky, které jsou hodnoceny, patří například správná morfologická struktura zony pellucidy (ZP), celistvá cytoplazma, míra

kompaktace v případě morul. U blastocyst se sleduje schopnost rozlišit jednotlivé buněčné vrstvy, jako je vnitřní buněčná masa – coelom a trofoblast. Oplozená embrya, která tato kritéria splňují, je možné rovnou přenést do příjemkyň, nebo je zamrazit a uchovat pro pozdější použití. Embrya v ranější fázi vývoje nebo ta, která nesplňují kritéria kvality pro okamžitý přenos, se mohou dokultivovat *in vitro*. Tímto způsobem je možné zachránit embrya, která by jinak byla znehodnocena. Embrya, která podstoupí další kultivaci v laboratoři, mají šanci se zregenerovat a pokračovat dále ve svém vývoji.

3.4. Převoz embryí

Vypláchnutá embrya, která jsou životaschopná, ale nejsou vhodná k okamžitému přenosu nebo uchování, se umístí do transferového média (BO-TRANSFER, IVF Bioscience, UK). Následně jsou embrya v médiu natažena do pejet o objemu 0,25 ml a převážena při teplotě 36-38 °C.

3.5. Dokultivace embryí

Embrya se poté nechají kultivovat do požadovaného stadia vhodného k přenosu nebo kryokonzervaci. Dokultivace probíhá v kultivačním médiu BO-IVC převrstveném minerálním olejem (IVF Bioscience, UK) a hypoxické komoře (38,5 °C, 6 % CO₂, 5 % O₂, BakerRuskin PhO₂Box) po dobu přibližně 24 hodin.

3.6. Zhodnocení dokultivace

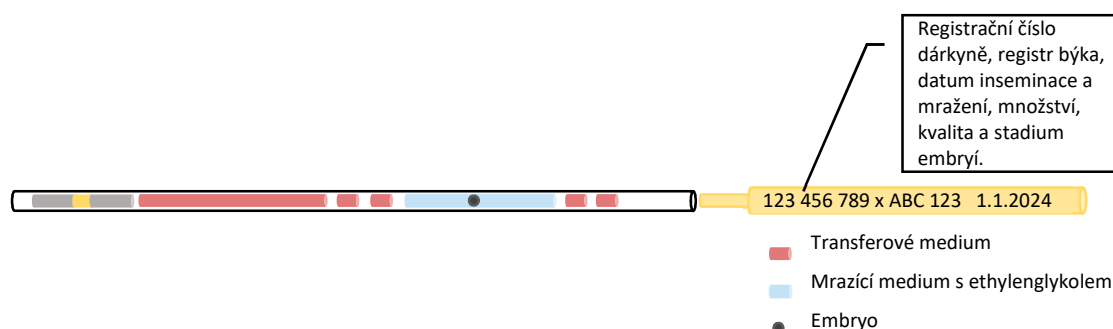
Mikroskopicky se zhodnotí kvalita embryí po cca 12 hodinách, následně se opakuje kontrola každé 2 hodiny, dokud embrya nejsou ve fázi kompaktní moruly či blastocysty. V této fázi jsou embrya vhodná k přenosu nebo kryokonzervaci.

3.7. Kryokonzervace embryí

Embrya, která byla dokultivovaná v laboratorních podmínkách do požadované fáze vývoje, se mohou uchovat pomocí kryokonzervace v tekutém dusíku. Kompaktní moruly nebo blastocysty jsou přeneseny do mrazicího média (ABT Ethylene glycol freeze with sucrose, ABT 360, USA). Embrya jsou s médiem natažena do 0,25 ml pejet a vložena do mrazicího přístroje (Freeze control, CL-5500, CryoLogic, AUS). Do pejet se společně s mrazicím médiem také přidává transferové médium, které slouží k proplachu embryí při rozmrazování. Embrya jsou umístěna přibližně uprostřed pejety. V takto připravené pejetě je možné

najednou zamrazit 1-5 embryí (Obrázek 1). Vzorky se ekvilibrují 5 min při počáteční teplotě mražení -6 °C. Poté se provede „seeding“ pomocí pinzety nachlazené v tekutém dusíku a vzorky se nechají při stejné teplotě dalších 5 min ekvilibrovat. V přístroji teplota postupně po dobu cca 60 min klesá až na teplotu -35 °C. Po dosažení této teploty jsou vzorky opět ekvilibrovány po dobu 5 min a poté jsou vloženy do tekutého dusíku (-196 °C).

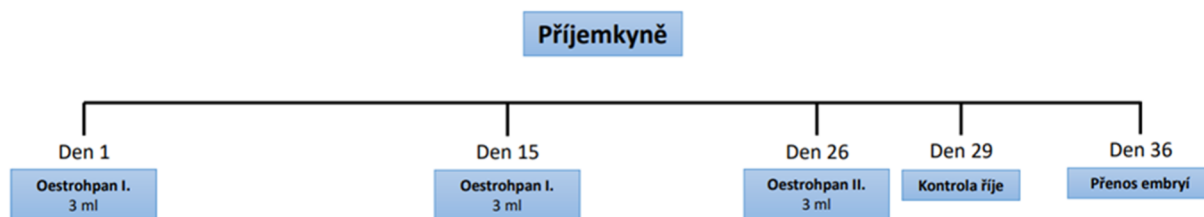
Obrázek 1, schéma pejetý na kryokonzervaci embryí.



3.8. Přenos do příjemkyň

Čerstvá nebo rozmražená embrya lze přenést do příjemkyň, které jsou připravené ve správné fázi cyklu (Tabulka 2). Příjemkyň musí být hormonálně synchronizované s cyklem dárkyň, aby byly schopné embrya přijmout. Přenos do příjemkyň (embryotransfer) je velmi podobný inseminaci a probíhá bez anestezie. Embryo je nataženo do speciálního katetru s malým množstvím transferového média (BO–TRANSFER, IVF Bioscience, UK). Tento katetr se přes děložní hrdlo zavede až do rohu dělohy, kam je embryo přeneseno. Třicet dní po přenosu je příjemkyň sonograficky vyšetřena k potvrzení březosti. Další kontrola ultrazvukem probíhá devadesát dní po přenosu embrya.

Tabulka 2, časové schéma hormonální stimulace příjemkyň pro systém MOET a přenos embryí.



4. Srovnání „novosti postupů“

Tato metodika slouží jako nástroj ke zvýšení efektivity běžného embryotransferu. Obvykle se přenášejí, případně zamrazují pouze ta embrya, která po výplachu dosáhla požadovaného vývojového stádia a kvality. Embrya, která těmto požadavkům neodpovídají, jsou většinou znehodnocena. V některých případech jsou tato embrya i přesto přenášena, ale úspěšnost jejich vývoje je velmi nízká. U klasického embryotransferu chybí dostatečný čas pro regeneraci embryí. Metoda *in vitro* dokultivace embryí zvyšuje úspěšnost embryotransferu tím, že umožňuje využít embrya, která by byla za běžných okolností znehodnocena.

V současné době je produkce embryí metodou *in vitro* produkce úspěšnější než produkce metodou *in vivo* (MOET) (Ferré et al., 2020). Jelikož dosud nebyla navržena metodika na dokultivaci vypláchnutých embryí s cílem zvýšení úspěšnosti systému MOET, přináší tato metoda nové možnosti pro zvýšení produkce potomků.

5. Popis uplatnění metodiky

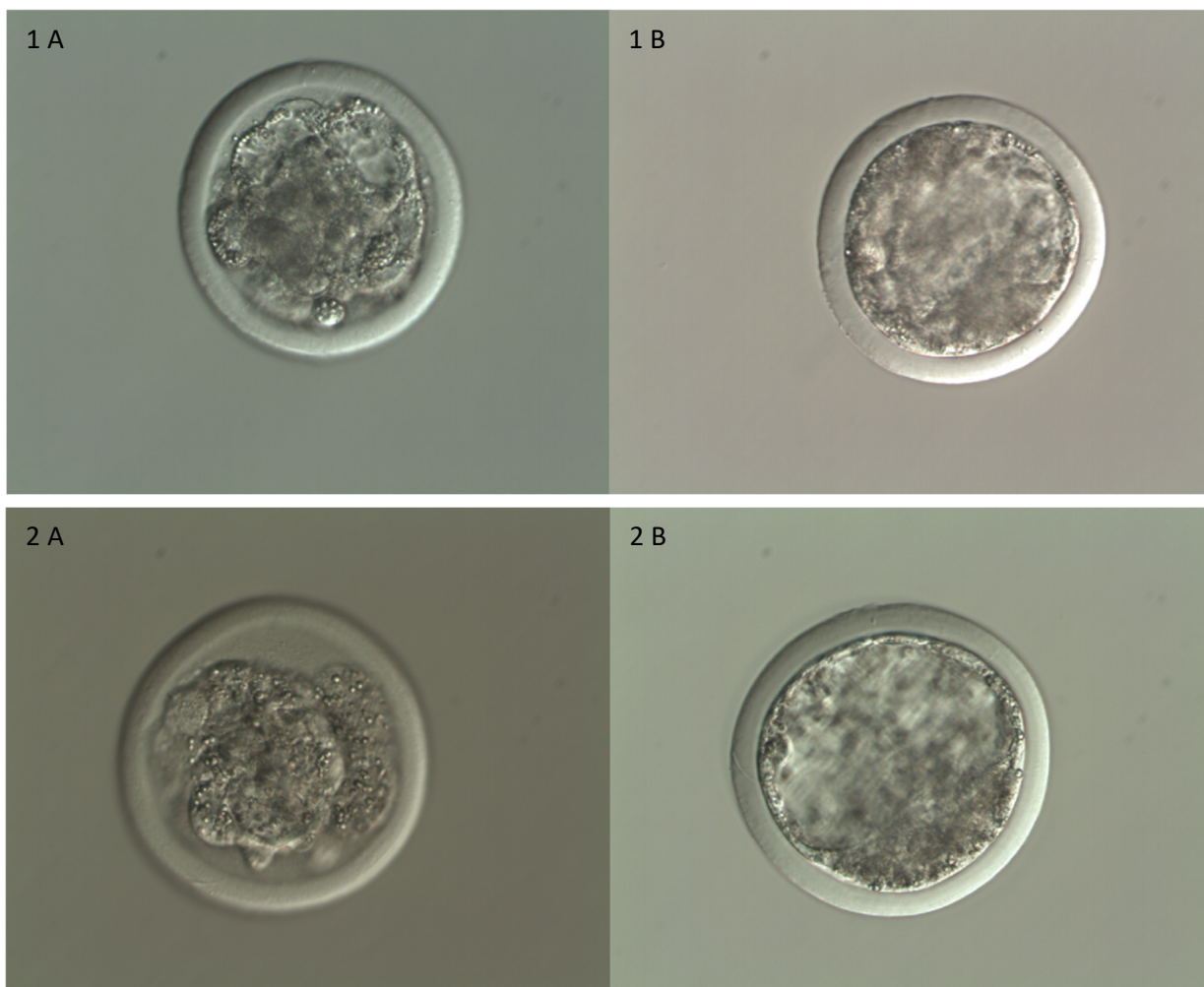
In vitro dokultivace embryí přináší možnost získání více kvalitních embryí pro budoucí přenosy, což je pro chovatele ekonomicky přínosné. Metodika je určena pro chovatele skotu s vysokou plemennou hodnotou a pro zachování populace hospodářských zvířat, řadících se do kategorie genetických zdrojů. Modifikace této metody lze využít i u dalších druhů savců ohrožených zvířat.

6. Výsledky

Výsledky našich experimentů ukazují, že úspěšnost dokultivace je poměrně vysoká (Tabulka 3). Celkem bylo v pokusu během třech výplachů získáno 39 embryí, která neměla dostatečnou kvalitu pro okamžitý přenos do příjemkyně nebo okamžitou kryokonzervaci. Z těchto nekvalitních embryí bylo 11 životaschopných, u nichž bylo možné provést následnou dokultivaci *in vitro*. Po dokultivaci došlo u živých embryí k vývoji do stádia blastocysty u 8 embryí. Celková úspěšnost dokultivace v našem experimentu činí 72,7 %. Výsledky naznačují možnost využití i takových embryí, která by bez metody dokultivace *in vitro* byla znehodnocena.

Tabulka 3, úspěšnost dokultivace embryí *in vitro*

Datum	Počet vypláchnutých embryí nevhodných k přenosu	Počet vypláchnutých živých embryí	Počet embryí, která byla dokultivována do stádia blastocysty	Úspěšnost dokultivace
6.6.2023	13	4	3	75 %
9.10.2023	15	3	2	66,7 %
10.5.2024	11	4	3	75 %
				Celková úspěšnost dokultivace
				72,7 %



Obrázek 2, vývoj embryí in vitro. (A) vypláchnutá embrya nevhodná k přenosu či kryokonzervaci, (B) dokultivovaná embrya ve stádiu blastocysty

Snímky 1 A a 2 A znázorňují embrya po výplachu, která nejsou dostatečně kvalitní k okamžitému embryotransferu. Tato embrya se nacházejí v raném stádiu embryonálního vývoje, který není dostatečný pro přenos do příjemkyně. Jejich struktura a buněčné uspořádání neodpovídá optimálnímu stavu, které je vyžadováno pro úspěšný embryotransfer. Na snímcích 1 B a 2 B lze pozorovat stejná embrya, u kterých došlo k procesu dokultivace v inkubátoru (Obrázek 2). Díky této dokultivaci embrya dosáhla stádia kvalitních blastocyst. V této fázi vývoje mají blastocysty charakteristickou strukturu s kompaktnějšími buňkami a jasně definovaným blastocoelem. Vývoj do stádia blastocysty je klíčový pro úspěšný embryotransfer, jelikož v této fázi je embryo nejlépe připraveno na implantaci v děloze příjemkyně.

7. Ekonomické aspekty

Průměrná cena jednoho embrya skotu se v současné době na trhu pohybuje kolem 3000 Kč. Pokud se pomocí této metody povede přenést více embryí než u běžného transferu, tak se výtěžnost embryotransferu výrazně zvýší. Dokultivace embryí probíhá v laboratoři přibližně jeden den, přičemž materiální náklady na dokultivaci cca 140 embryí se pohybují kolem 1500 Kč.

8. Poděkování

Autoři publikace tímto děkují společnosti 1. zemědělská a.s. Chorušice a Národnímu programu pro ochranu genetických zdrojů hospodářských zvířat za jejich spolupráci během zpracování této práce. Jejich pomoc byla důležitá pro získání potřebných informací a dat.

9. Seznam použitých zkratk

BSA – bovinní sérový albumin

OE – Oestrophan

FSH – folikul stimulující hormon

IU – international unit, mezinárodní měrná jednotka

LH – luteinizační hormon

MOET – multiple ovulation and embryo transfer, superovulace a přenos embryí

ZP – zona pellucida

10. Seznam použité související literatury

Ferré, L. B., Kjelland, M. E., Strøbech, L. B., Hyttel, P., Mermillod, P., & Ross, P. J. (2020). Review: Recent advances in bovine in vitro embryo production: reproductive biotechnology history and methods. *Animal*, 14(5), 991–1004. <https://doi.org/10.1017/S1751731119002775>

McDaniel, B. T., & Cassell, B. G. (1981). Effects of Embryo Transfer on Genetic Change in Dairy Cattle. *Journal of Dairy Science*, 64(12), 2484–2492. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(81\)82873-1](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(81)82873-1)

Smith, C. (1988). Applications of embryo transfer in animal breeding. *Theriogenology*, 29(1). [https://doi.org/10.1016/0093-691X\(88\)90040-4](https://doi.org/10.1016/0093-691X(88)90040-4)

11. Seznam publikací, které předcházely metodice a byly publikovány.

Dosud nebyly žádné články k této problematice publikovány.

Vydal: Výzkumný ústav živočišné výroby, v. v. i., Praha Uhřetěves
Název: In vitro dokultivace embryí skotu při použití systému MOET
Autoři: Ing. Tereza Ranná (40 %)
Ing. Markéta Kohoutová (25 %)
Mgr. Kristýna Vacková (25 %)
Ing. Jana Rychtářová, Ph.D. (10 %)

ISBN 978-80-7403-331-5

Vydáno bez jazykové úpravy.

© Výzkumný ústav živočišné výroby, v. v. i., Praha Uhřetěves

Výzkumný ústav živočišné výroby, v. v. i.

Přátelství 815

104 00 Praha Uhřetěves

WWW.VUZV.CZ