

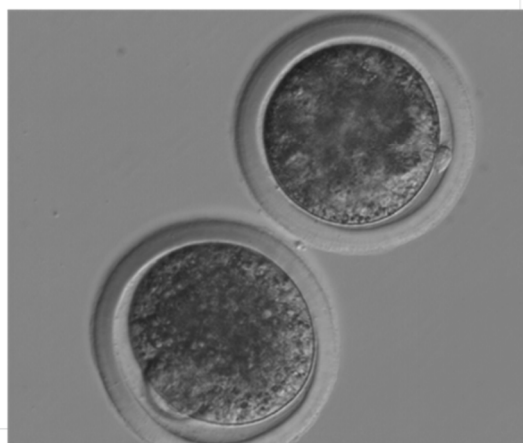
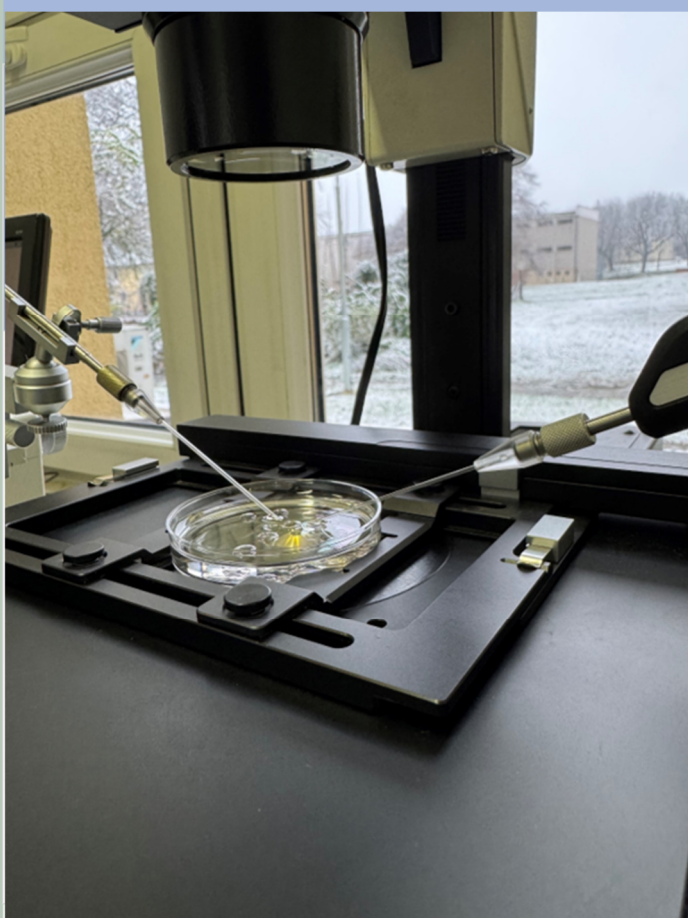
Kristýna Vacková

Markéta Kohoutová

Tereza Ranná

Jana Rychtářová

VITRIFIKACE ZÁRODEČNÝCH VÁČKŮ SKOTU



CERTIFIKOVANÁ METODIKA

Vitrifikace zárodečných váčků skotu

Autoři:

Mgr. Kristýna Vacková

Ing. Markéta Kohoutová

Ing. Tereza Ranná

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 projektu podpory na rozvoj výzkumné organizace VÚŽV, v. v. i.: MZE RO0724, DKRVO V-01-01 s názvem „Vitrifikace zárodečných váčků živočišných druhů patřících do genetických zdrojů ČR“ a projektu TN02000017 „Národní Centrum Biotechnologií ve Veterinární Medicíně – NaCeBiVet“ (poskytovatel Technologická agentura České republiky).

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 **Mgr. Kristýna Vacková**



Česká plemenářská inspekce

Slezská 100/7, Praha 2, 120 00

v y d á v á

OSVĚDČENÍ

9455/2024-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: **Vitrifikace zárodečných vajíčků skotu**

Autor / autoři: Mgr. Kristýna Vacková, Ing. Markéta Kohoutová, Ing. Tereza Ranná, 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 podpory na rozvoj výzkumné organizace VÚŽV, v.v.i.: MZE RO0724, DKRVO V-01-01 s názvem „Vitrifikace zárodečných vajíčků živočišných druhů patřících do genetických zdrojů ČR“ a projektu TN02000017 „Národní Centrum Biotechnologií ve Veterinární medicíně – NaCeBiVet“ (poskytovatel Technologická agentura České republiky).

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
OÚ: ovstg, Zdenka Majzlíková,
o: CZ, o: Česká plemenářská
inspekce, ou=45,
email=z.majlikova@cpinsp.cz
Datum: 2024.12.16 06:52:40 +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
09:42:56 +01'00'

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

Obsah

1.	Úvod	5
2.	Cíl metodiky	5
3.	Vlastní popis metodiky	5
3.1.	<i>Izolace oocytů</i>	5
3.2.	<i>Příprava oocytů pro mikromanipulaci</i>	6
3.3.	<i>Izolace karyoplastů</i>	6
3.4.	<i>Vitrifikace</i>	6
3.5.	<i>Rozmražení karyoplastů</i>	6
3.6.	<i>Fúze</i>	7
4.	Srovnání „novosti postupů“	7
5.	Popis uplatnění metodiky.....	8
6.	Ekonomické aspekty	8
7.	Seznam použitých zkratk	8
8.	Seznam použité související literatury	9
9.	Seznam publikací, které předcházely metodice a byly publikovány	9
10.	Přílohy	10

1. Úvod

Uchování samičích gamet je z hlediska kryoprezervace na samém okraji využití. Nicméně vzhledem k přirozené sezónnosti v reprodukčním procesu zvířat a pro „SOS situace“ je uchování samičích gamet klíčové a nezbytné. Sperma a embrya savců mohou být efektivně uchovávána v kryokonzervované formě v tekutém dusíku. Kryokonzervace oocytů, obzvláště nezralých (ve fázi GV), je oproti kryokonzervaci spermatu či embryí náročnější (Nakagawa et al., 2008). V současné době se této oblasti věnuje minimální pozornost a to zejména z důvodu velmi nízké úspěšnosti. Ta pramení ze složení oocytů mnohých zvířat, kde je velký podíl cytoplazmy, která je tvořena lipidovými strukturami. Ty způsobují komplikace při realizaci kryokonzervace samičích gamet. Je možné je sice odstranit, ale jejich přítomnost má svoje opodstatnění, protože slouží jako zdroj energie pro zrání oocytů a časný embryonální vývoj. Jejich absence by proto měla nežádoucí dopad. Buňky před kryokonzervací podléhají dehydrataci a nahrazení vody kryoprotektivy v mrazícím médiu. Čím větší buňka, tím je proces dehydratace a rehydratace při procesu kryokonzervace náročnější. Vědecké skupiny se neustále snaží optimalizovat proces kryokonzervace oocytů (Casciani et al., 2023). Jednou z možností, jak docílit efektivnějšího uchování samičího genetického materiálu pro použití v asistované reprodukci je kryokonzervovat pouze část oocyty, která obsahuje genetickou informaci (Nakagawa et al., 2011; Křen et al., 2005). Proto je pro daný postup v zásadě nezbytné jenom uchování jádra. Při spojení metod vitrifikace s pokročilými metodami mikromanipulace lze tohoto cíle dosáhnout.

2. Cíl metodiky

Součástí programu pro záchranu genetických zdrojů České republiky je kryokonzervace genetického materiálu, která slouží jako zdroj genových rezerv. Aktuálně se používá k zachování genových rezerv v „Programu *in vitro*“ kryokonzervace embryí, spermatu a oocytů. Kryokonzervace oocytů má však relativně nízkou úspěšnost z důvodu velikosti buňky. Oocyt skotu dosahuje velikosti přibližně 100-120 μm , z čehož většinu tvoří cytoplasma. Mražením samotného karyoplastu, který obsahuje DNA, se velikost kryokonzervovaného materiálu výrazně zmenší. Tím je možné zvýšit pravděpodobnost přežití genetického materiálu oocyty po rozmrazení. Cílem metodiky je tedy vyvinout a popsat alternativní způsob kryokonzervace biologického materiálu od plemen skotu zařazených do genetických zdrojů ČR.

3. Vlastní popis metodiky

Pokud není uvedeno jinak, všechny chemikálie jsou získány od Sigma-Aldrich.

3.1. Izolace oocytů

Pro potřeby této metodiky byly oocyty získávány izolací z vaječníků jatečných zvířat, dále pak po úhynu či utracení geneticky cenného zvířete. Oocyty jsou aspirovány spolu s folikulární tekutinou a granulózními buňkami z jednotlivých folikulů. Oocyty lze získávat od žijícího jedince pomocí metody OPU (ovum-pick up), kde se folikulární tekutina z vaječníků získává jehlou připojenou na odsávací zařízení. Z aspirované folikulární tekutiny se izolují oocyty.

Oocyty ve folikulech se nacházejí ve fázi profáze I, ve stadiu zárodečného váčku (GV). Po vyjmutí z folikulu a kultivaci za vhodných, přesně řízených podmínek oocyty samovolně pokračují v meiotickém dělení. Aby nedocházelo k dozrání oocyty, které počiná rozpadem membrány zárodečného váčku,

je vhodné do manipulačního (M2 medium) i kulturačního media (M199, 0,2M Na pyruvát, 50 µg/ml gentamicin, 4 mg/ml BSA) přidat inhibitor fosfodiesterázy 3A, milrinone (2,5 µM), který brání oocyty pokračovat v meiotickém cyklu.

3.2. Příprava oocytů pro mikromanipulaci

Po kultivaci (60 min při teplotě 38,5 °C s obsahem 6 % CO₂ v atmosféře) se oocyty denudují pomocí 0,1% roztoku hyaluronidázy v M2 médiu. Při denudaci se oocyt zbavuje kumulárních buněk, které ho obklopují a při následné mikromanipulaci by překážely. Protože oocyty skotu obsahují velké množství tukových granul v cytoplasmě, jsou před izolací zárodečných váčků pro lepší viditelnost jednotlivých struktur centrifugovány (5500 rpm, 5 min, Eppendorf miniSpin). Tuková granula se tím nahromadí v jedné hemisféře cytoplasmy a zárodečný váček je tak lépe viditelný. S oocyty je mikromanipulováno v manipulačním mediu (M2) s 5 µg/ml cytochalasinu B a 3 µg/ml nocodazolu.

3.3. Izolace karyoplastů

Izolace karyoplastů (zárodečných váčků obklopených cytoplasmou) je prováděna pomocí mikromanipulátoru (invertovaný mikroskop Leica DMIL s mikromanipulační jednotkou Leica). Fixační pipetou (s vnitřním průměrem přibližně 30 µm s částečně zataveným ústím) se oocyt stabilizuje a manipulační pipetou (s vnitřním průměrem 20-30 µm s mírně zataveným ústím, aby nebyla pipeta příliš ostrá a nepoškodila zárodečný váček) se pronikne skrz zonu pellucidu (ZP). Manipulační pipeta je napojena na systém piezo (Eppendorf PiezoXpert s dvěma mikroinjektory Eppendorf CellTram 4r Oil), který skrz pipetu generuje elektrické pulzy pro citlivý průnik přes ZP. Zárodečný váček je manipulační pipetou nasát s minimálním množstvím cytoplasmy. Cytoplazmatická membrána se zacelí a obě struktury zůstávají membránou ohraničené. Vyjmutý karyoplast je manipulační pipetou vložen do prázdné ZP, která slouží jako schránka pro karyoplasty (Obrázek 1). Do jedné ZP se pro optimální přežití kryokonzervace vloží přibližně 5 karyoplastů.

3.4. Vitřifikace

Karyoplasty v ZP jsou vitřifikovány. Vitřifikace je rychlý způsob kryokonzervace, při kterém se používají mrazící media s vysokou koncentrací kryoprotektiv. Vzorky se v mrazícím mediu na nosiči (pejeta, cryotop, atd.) vkládají přímo do tekutého dusíku. Příprava na kryokonzervaci probíhá promýváním karyoplastů v ZP v postupné řadě roztoků se zvyšující se koncentrací kryoprotektiv. Nejprve jsou karyoplasty v ZP vloženy na 10 s do ekvilibračního media (M199 + 10 % FCS), dále se vloží na 30 s do prvního roztoku M199 s 10 % DMSO, 10 % ethylenglykolu (EG) při laboratorní teplotě. Na dalších 25 s se karyoplasty vloží do roztoku M199 s 20 % DMSO a 20 % EG při laboratorní teplotě. Karyoplasty natáhnou spolu s malým množstvím mrazícího media (cca 5 µl) do pejety a jsou vloženy do tekutého dusíku, kde mohou být dlouhodobě uchovávány. Celé oocyty ve fázi GV, které sloužily jako kontrolní skupina, jsou vitřifikovány stejným způsobem jako karyoplasty (Tabulka 1).

3.5. Rozmražení karyoplastů

Pejeta s karyoplasty se vyjme z kontejneru s tekutým dusíkem, 10 s se nechá zahřívát při laboratorní teplotě, poté se na dalších 10 s vloží do vodní lázně o teplotě cca 38 °C. Obsah pejety je vytlačen do prvního rozmrazovacího media (M199 + 0,25 M sacharóza, 5 min, 36-38 °C). Karyoplasty jsou následně přeneseny do druhého rozmrazovacího media (M199 + 0,15 M sacharózy, 5 min, 36-38 °C), které je

posléze odmyto v manipulačním mediu M2. Karyoplasty jsou přeneseny do kultivačního media (BO-IVC, IVF Bioscience) a na 2 hodiny uloženy do inkubátoru (38,5 °C, 6 % CO₂).

3.6. Fúze

Recipientní oocyty jsou pomocí manipulační pipety zbaveny zárodečných váčků. Vznikají tak cytoplasty. Jednotlivé rozmražené dárcovské karyoplasty jsou pomocí manipulační pipety vyjmuty ze ZP a přeneseny k předem připraveným cytoplastům (Obrázek 2). Před fúzí jsou tyto produkty kultivovány 30 min v M199 s inhibitorem milrinone (2,5 µM) při 38,5 °C, 6 % CO₂. Karyoplasty s cytoplasty jsou fúzovány pomocí elektrofúzovacího přístroje CF-150B (BLS, 1-2 pulzy při 35 V stejnosměrného proudu a 2 V střídavého proudu na 40 µs) v mediu M2 s 0,3M roztokem glukózy a 10 mg/ml BSA. Fúzované oocyty se vloží do kultivačního media (BO-IVC, IVF Bioscience) a po 24-26 hodinách je provedena kontrola, zda oocyt došel do fáze metafáze II (MII), tedy vyloučil pólové tělísko (Tabulka 2).

4. Srovnání „novosti postupů“

Metoda kryokonzervace jaderného materiálu oocytů, za účelem zmenšení velikosti buňky, byla v minulosti již použita například v případě myších oocytů ve fázi zárodečného váčku, tedy nezralých oocytů (Křen et al., 2005). V této studii byly pomocí mikromanipulačních technik izolovány zárodečné váčky obalené malou částí cytoplasmy spolu s cytoplasmatickou membránou (karyoplasty). Oocyty byly před samotnou mikromanipulací zbaveny ZP pomocí roztoku pronázy pro jednodušší mikromanipulaci. Izolované karyoplasty byly vloženy do prázdné ZP a následně byly vitrifikovány. Po rozmražení byly fúzovány s cytoplasty, které byly zbaveny ZP. Tento pokus sloužil k ověření, zda jsou myší karyoplasty ve stadiu zárodečného váčku schopny sfúzovat s recipientními cytoplasty. Tato metoda byla také použita na prasečích oocytech ve fázi zárodečného váčku (Nakagawa et al., 2011). Podobně jako v předchozí studii, karyoplasty byly izolovány z oocytů a vitrifikovány v prázdné ZP. Po rozmražení byly fúzovány s cytoplasty, které měly ZP a bylo tedy možné ověřit nejen zda se mohou karyoplasty s cytoplasty spojit, ale také zda jsou takto vytvořené oocyty schopné pokračovat ve vývoji. Pro tento účel se nechaly oocyty maturovat a byly partenogeneticky aktivovány.

Kromě karyoplastů z nezralých oocytů lze izolovat a kryokonzervovat i karyoplasty ze zralých oocytů ve fázi MII, jak bylo dokázáno na ovčím modelu (Hosseini et al., 2015). V této studii byly izolovány chromozomy spolu s malou částí cytoplasmy obalené cytoplasmatickou membránou. V případě izolace karyoplastu z již vitrifikovaného oocytu a následného vložení do čerstvého cytoplastu byla úspěšnost vývoje do blastocyst po partenogenetické aktivaci vyšší než v případě použití celých vitrifikovaných oocytů či čerstvých karyoplastů vložených do vitrifikovaných cytoplastů.

Izolovat a kryokonzervovat lze i prvojádra získaná ze zygot. Ve studii z roku 2003 byla použita izolace samičích prvojader a pólových tělísek z myších zygot, která byla následně kryokonzervována. Po rozmražení byla prvojádra a pólová tělíška sfúzována s recipientními zygotami, které byly zbaveny samičího prvojádra a obou pólových tělísek (He et al., 2003).

Dosud nebyla předložena metodika na kryokonzervaci karyoplastů bovinních oocytů s cílem navrhnout metodu jako alternativní způsob pro uchovávání samičího genetického materiálu. Tato metoda má široké využití, zejména u geneticky cenných jedinců a také plemen řadících se do genetických zdrojů České republiky.

5. Popis uplatnění metodiky

Metodika byla vyvinuta prioritně k využití pro Národní centrum pro genetické zdroje zvířat jako alternativní způsob uchování genetického materiálu v genobankách. Životaschopnost kryokonzervovaných oocytů je oproti ostatnímu genetickému materiálu skladovanému v genobankách (embrya, spermie) velmi nízká. Pro zvýšení šance udržet, případně zvýšit populaci hospodářských zvířat patřících do genetických zdrojů ČR, je vhodné neustále zlepšovat způsoby uchovávání jejich genetického materiálu. Tato metodika je zaměřena především na genetický materiál skotu, ale v budoucnu by mohla být prováděna na oocytech ostatních druhů nejen hospodářských zvířat.

Metodiku je možné v budoucnu použít nejen pro zachování genových rezerv, ale i pro komerční účely. Kryokonzervace oocytů je metoda žádaná i v případě uchování genetického materiálu samic hospodářských zvířat s vysokou plemennou hodnotou. Optimalizace metody pro kryokonzervaci oocytů by mohla chovatelům a šlechtitelům ušetřit mnoho nákladů za „neúspěšně zmražené oocyty“. V případě úhynu, či zranění plemence s dobrým původem, které jí znemožňuje se přirozeně reprodukovat, je tak možné zvýšit šanci na získání potomků alternativním způsobem kryokonzervace oocytů s potenciálně vyšší úspěšností jejich přežití.

6. Ekonomické aspekty

Metodika je určena pro laboratoře, které jsou vybaveny mikromanipulátorem, světelným mikroskopem, stereolupou, laminárním boxem a inkubátorem s řízenou teplotou a obsahem CO₂ v atmosféře. Vstupní náklady na zavedení metodiky v takto vybavené laboratoři pak činí přibližně 50 000 Kč na materiál (chemikálie, laboratorní plastik, pejetý). Metodika je určena jak pro komerční využití, tak především pro optimalizaci uchovávání samičího genetického materiálu zvířat zařazených do genetických zdrojů ČR pro zachování národního bohatství.

7. Seznam použitých zkratk

BSA – bovine serum albumin, bovinní albuminové sérum

DMSO – dimethylsulfoxid, látka používaná jako kryoprotektivum

EG – ethylenglykol, látka používaná jako kryoprotektivum

FCS – foetal calf serum, fetální telecí sérum

GV – germinal vesicle, zárodečný váček, konformace jádra v nezralém oocytu

MII – metafáze II, fáze meiotického cyklu

OPU – ovum-pick up, metoda aspirace folikulární tekutiny

Rpm – revolutions per minute, otáček za minutu

ZP – zona pellucida, glykoproteinový obal chránící oocyt

8. Seznam použité související literatury

Casciani V, Monseur B, Cimadomo D, Alvero R, Rienzi L. Oocyte and embryo cryopreservation in assisted reproductive technology: past achievements and current challenges. *Fertil Steril*. 2023;120(3 Pt 1):506-520. doi:10.1016/j.fertnstert.2023.06.005

He Z, Liu HC, Rosenwaks Z. Cryopreservation of nuclear material as a potential method of fertility preservation. *Fertil Steril*. 2003;79(2):347-354. doi:10.1016/s0015-0282(02)04674-5

Hosseini SM, Asgari V, Hajian M, Nasr-Esfahani MH. Cytoplasmic, rather than nuclear-DNA, insufficiencies as the major cause of poor competence of vitrified oocytes. *Reprod Biomed Online*. 2015;30(5):549-552. doi:10.1016/j.rbmo.2015.01.003

Kren R, Fulka J, Fulka H. Cryopreservation of isolated mouse germinal vesicles. *J Reprod Dev*. 2005;51(2):289-292. doi:10.1262/jrd.16071

Nakagawa S, Yoneda A, Hayakawa K, Watanabe T. Improvement in the in vitro maturation rate of porcine oocytes vitrified at the germinal vesicle stage by treatment with a mitochondrial permeability transition inhibitor. *Cryobiology*. 2008;57(3):269-275. doi:10.1016/j.cryobiol.2008.09.008

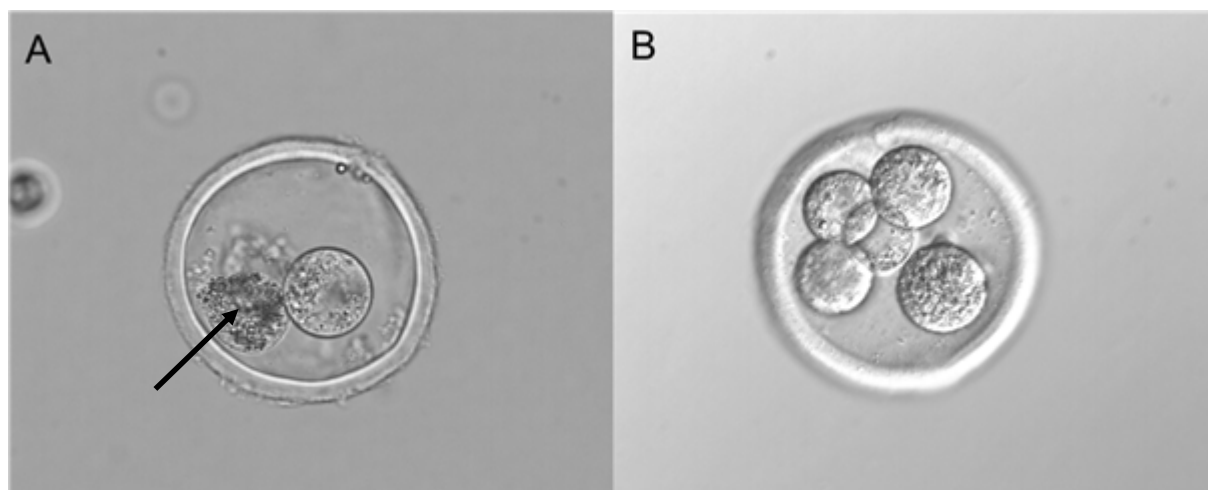
Nakagawa S, Maedomari N, Kikuchi K, et al. Vitrification of fully grown and growing porcine oocytes using germinal vesicle transfer. *J Reprod Dev*. 2011;57(3):335-341. doi:10.1262/jrd.10-177h

9. Seznam publikací, které předcházely metodice a byly publikovány

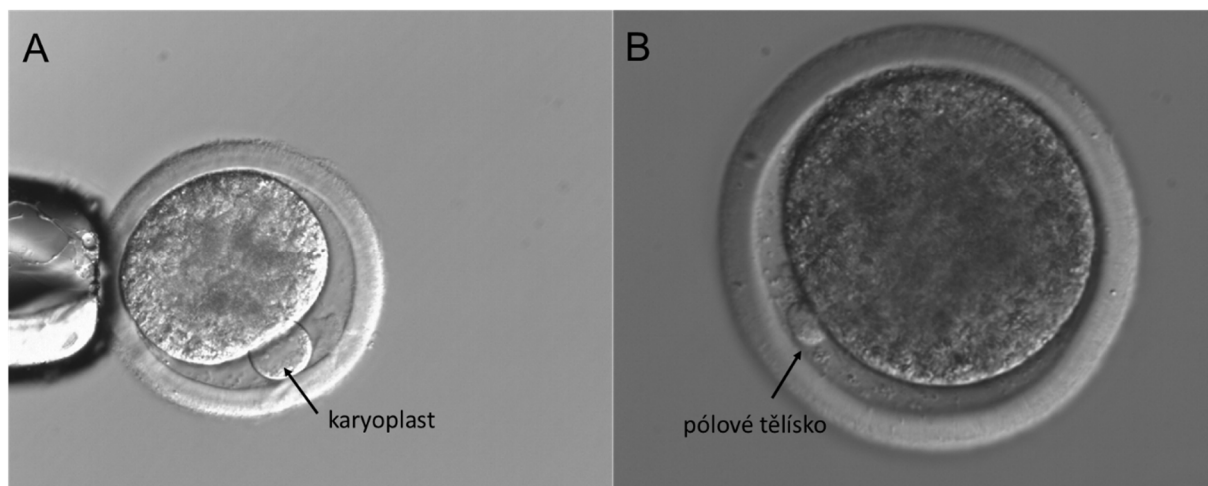
Kren R, Fulka J, Fulka H. Cryopreservation of isolated mouse germinal vesicles. *J Reprod Dev*. 2005;51(2):289-292. doi:10.1262/jrd.16071

Nakagawa S, Maedomari N, Kikuchi K, et al. Vitrification of fully grown and growing porcine oocytes using germinal vesicle transfer. *J Reprod Dev*. 2011;57(3):335-341. doi:10.1262/jrd.10-177h

10. Přílohy



Obrázek 1, karyoplasty v ZP po rozmražení, 1A – vlevo (šipka) mrtvý karyoplast, 1B – živé karyoplasty, zvětšení 400x.



Obrázek 2, 2A – dárcovský karyoplast vložený k recipientnímu cytoplasmu, 2B – zrekonstruovaný oocyt ve fázi MII po dokončení zrání, zvětšení 400x.

Tabulka 1, úspěšnost vitrifikace karyoplastů

	Počet vitrifikovaných oocytů/karyoplastů	Počet životaschopných oocytů/karyoplastů po rozmražení	Procentuální podíl úspěšnosti vitrifikace
Karyoplasty	84	61	72,6 %
Kontrolní oocyty	36	13	36,1 %

Tabulka 2, úspěšnost spojení karyoplastů s cytoplasmou a dozrání oocytu do metafáze II

	Fúzováno	MI	Úspěšnost fúze a dozrání
Nově zrekonstruované oocyty	13	8	61,5 %

Vydal: Výzkumný ústav živočišné výroby, v. v. i., Praha Uhřetěves

Název: Vitifikace zárodečných váčků skotu

Autoři: Mgr. Kristýna Vacková (50 %)
Ing. Markéta Kohoutová (15 %)
Ing. Tereza Ranná (15 %)
Ing. Jana Rychtářová, Ph.D. (20 %)

ISBN 978-80-7403-330-8

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](http://www.vuzv.cz)