

A decorative L-shaped frame made of thick black lines, with the top-left corner on the left and the bottom-right corner on the right, framing the central text.

EMBRYOTECHNOLOGIE VE VETERINÁRNÍ PRAXI

Doc. Ing. Jiří Šichtař, Ph.D.

EmbryoLab s.r.o.

Doc. Ing. Jiří Šichtař, Ph.D.

- Česká zemědělská univerzita v Praze
 - *Obor Reprodukční biotechnologie (Ing.)*
 - *Katedra veterinárních disciplín: reprodukce zvířat*
 - management reprodukce, ultrasonografie, ovariální dynamika, IVPE

- FarmVet s.r.o.
 - *biotechnolog*

FarmVet.cz

- EmbryoLab s.r.o.
 - *In vitro produkce embryí skotu a koní (z živých dárkyň, vaječníků)*

EmbryoLab

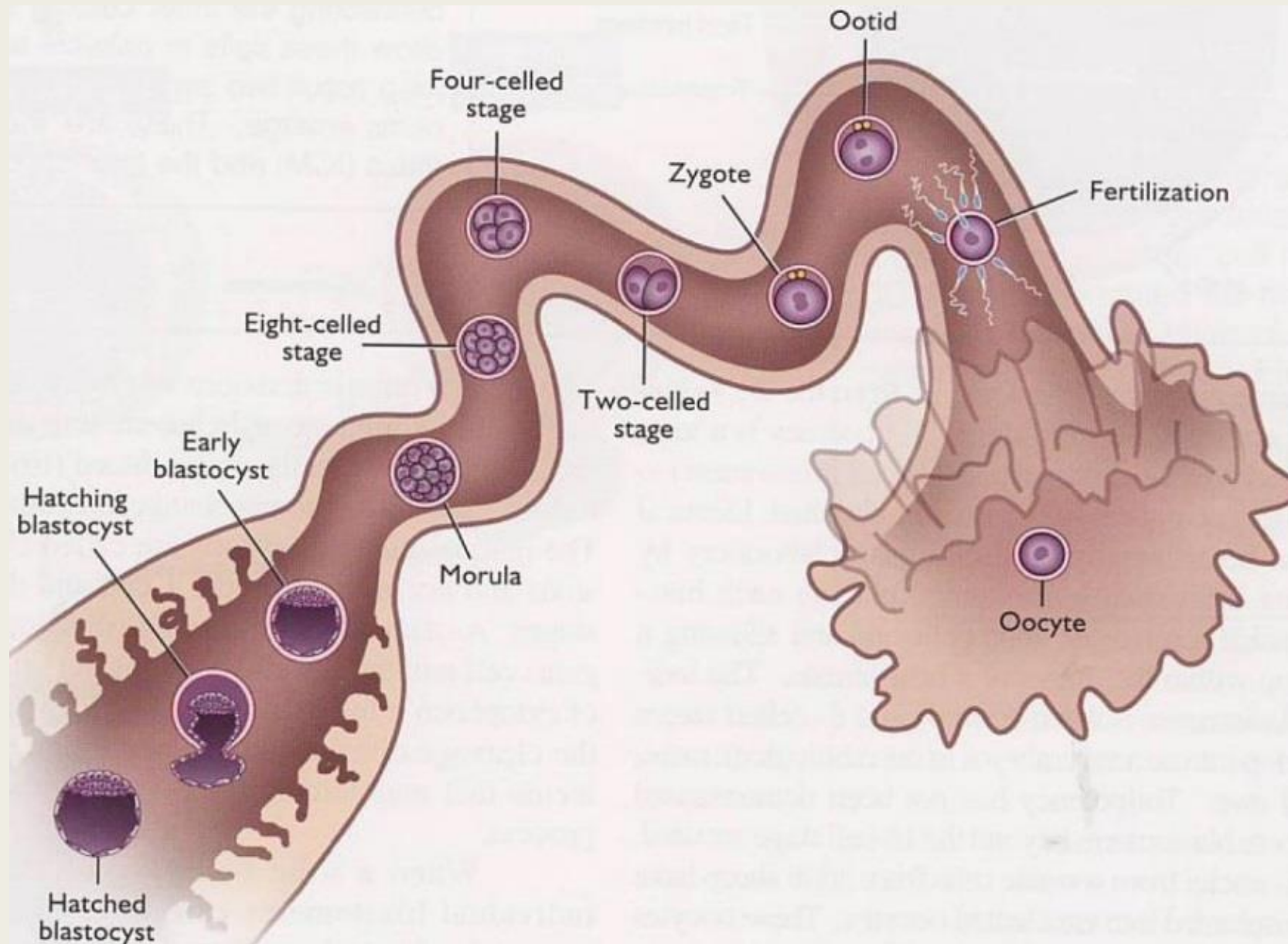


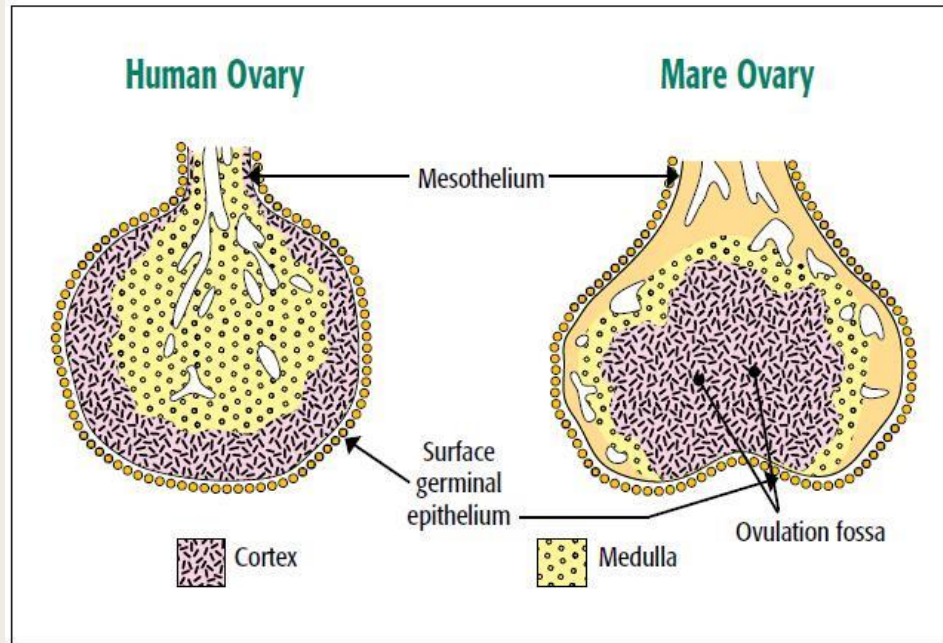
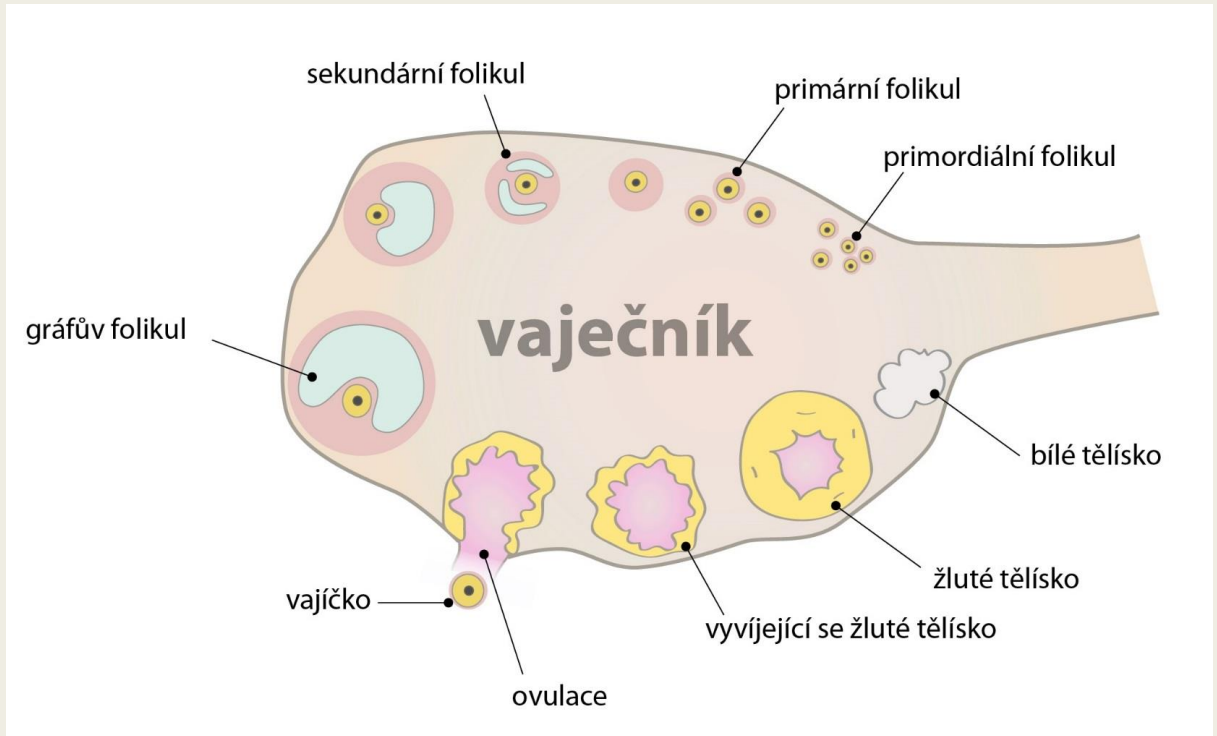
Vývoj embrya

- Vývoj lidského i zvířecího embrya má samozřejmě mnoho společných znaků
- Existují však mezidruhové rozdíly
- Nejprobádanější jsou embrya a plody hospodářských zvířat (skot, prasata, koně, velbloudi, ...)

- Ve veterinární praxi se nejčastěji pracuje s rannými vývojovými stádii embryí (drtivá většina moruly nebo blastocysty)
- S tím jde ruku v ruce studium ovariální dynamiky
 - *Synchronizace folikulárního vývoje*
 - *Manipulace s životností žlutého tělíska*

Tradiční průběh...





- spermie doputují z pochvy až do vejcovodu během několika minut
- přežívají několik hodin (insem. dávka) nebo dní (nativní sperma)

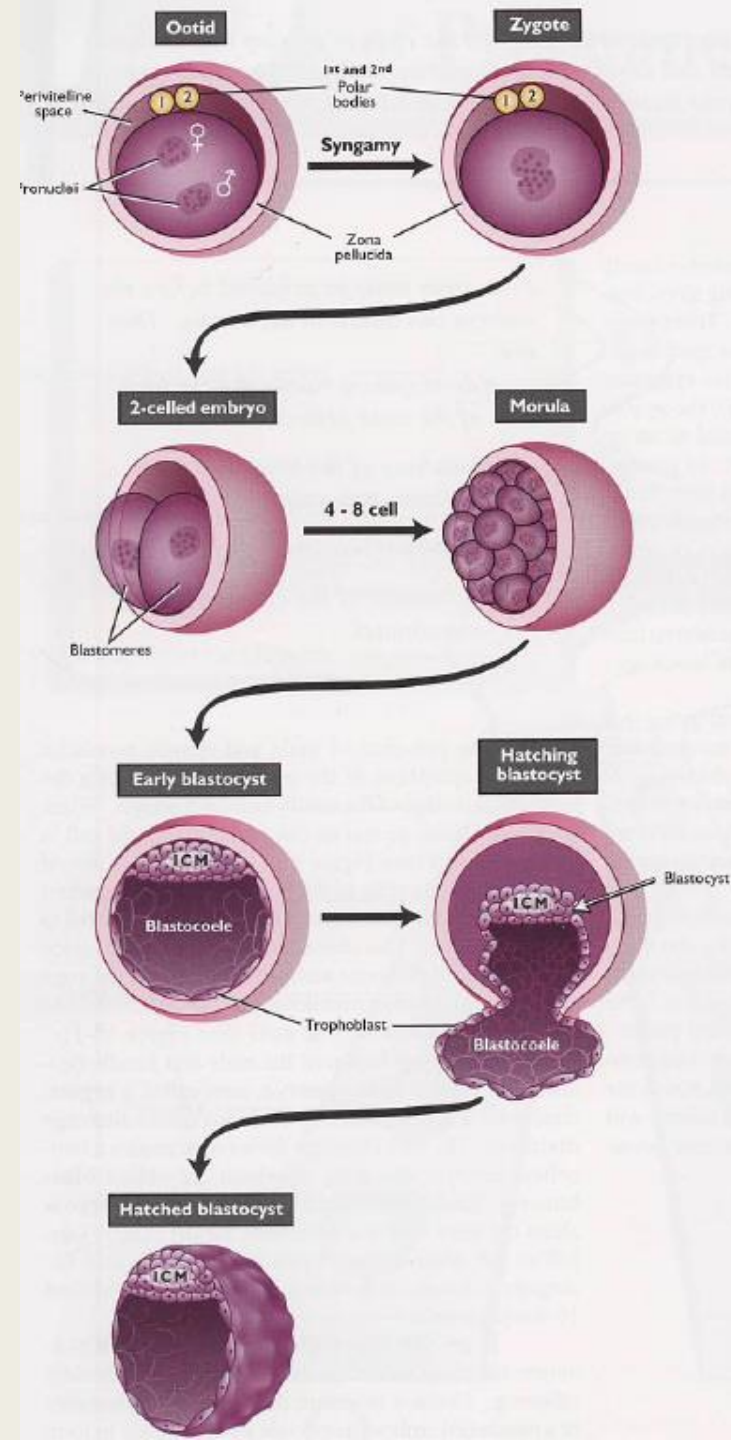
živočich	doba mezi kopulací a dosažením oviduktu spermií
skot	2-3 min
prase	15 min
myš	15 min
pes	min – několik hod
ovce	6 min – 5 hod
člověk	5 min – 7 hod (68 min)

živočich	fertilita spermie v oviduktu
myš	6 hod
člověk	24-48 hod
skot	28-50 hod
ovce	30-48 hod
kůň	144 hod
netopýr	135 dní

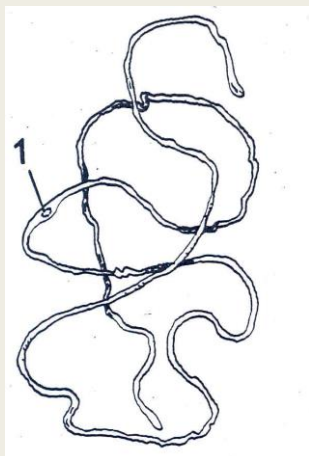
- pro uplatnění oplozovací schopnosti musí spermie projít kapacitací a akrozomální reakcí

Vývoj nového jedince

■ 1. Časné embryo



■ 2. Pozdní embryo



■ 3. Plod

Mezidruhové rozdíly v ranné fázi vývoje

Table 6-1: Times of passage of the embryo from the oviduct into the uterus, and of blastocyst formation, in different species

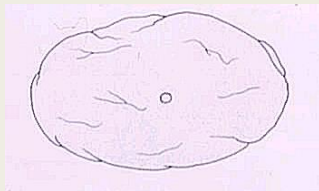
Species	Passage into the uterus		Time of blastocyst formation (days after ovulation)
	Days after ovulation	Stage of development	
Pig	2	4–8 cell	5–6
Cattle	3–3 ½	8–16 cell	7–8
Sheep	3	8–16 cell	6–7
Horse	5–6	Morula	6
Dog	8	Blastocyst	8

Kde najdeme embryo?

■ Skot

- „Sedí“ ipsilaterálně k ovulujícímu vaječníku
- V kraniální části děložního rohu
- 13. den 3 mm, další 4 dny 250 mm

8.-9. den



9. den



■ Prase

- Rovnoměrná distribuce po celé děloze
- 10. den 2 mm, 24-48 h 200, 16. den 800-1000 mm

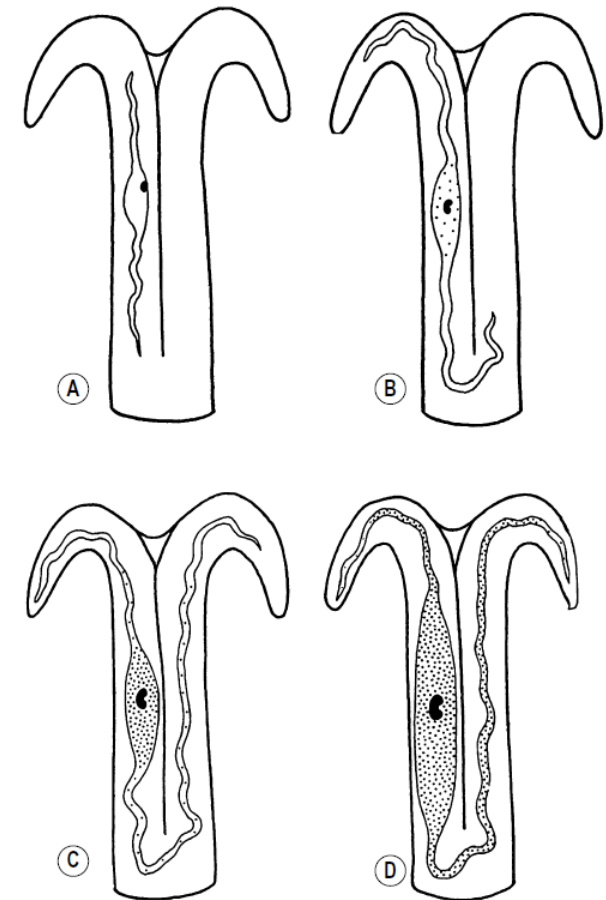
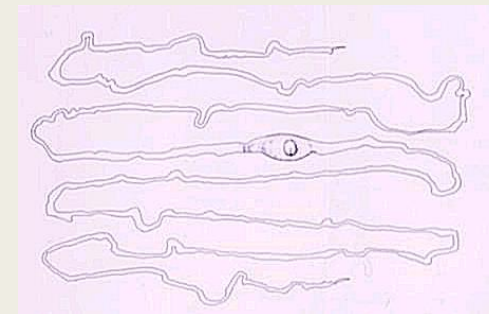


Fig. 6-12: Elongation of bovine embryos around Days 16 (A), 18 (B), 22 (C), and 27 (D) of development. Courtesy Sinowatz and Rüsse (2007).

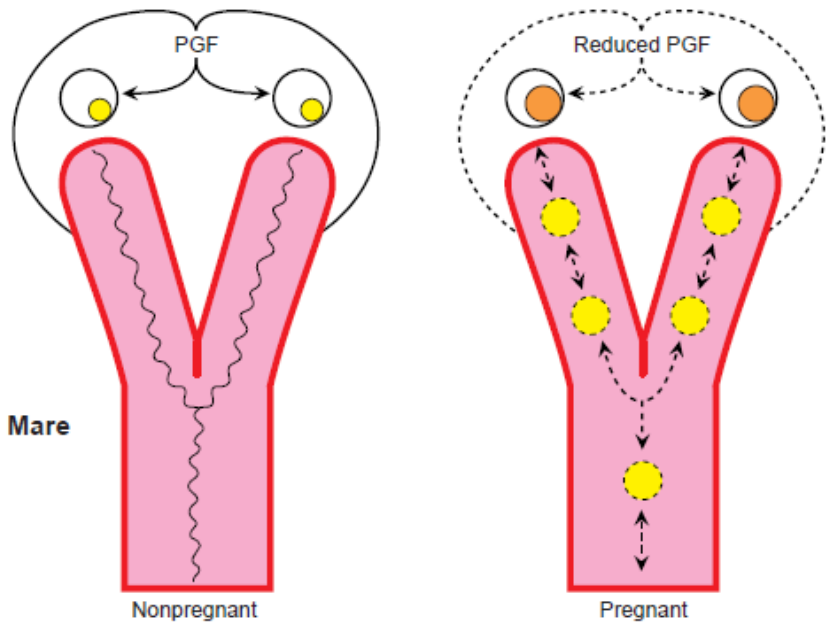


Cca 16. den

Kde najdeme embryo?

■ Klisna

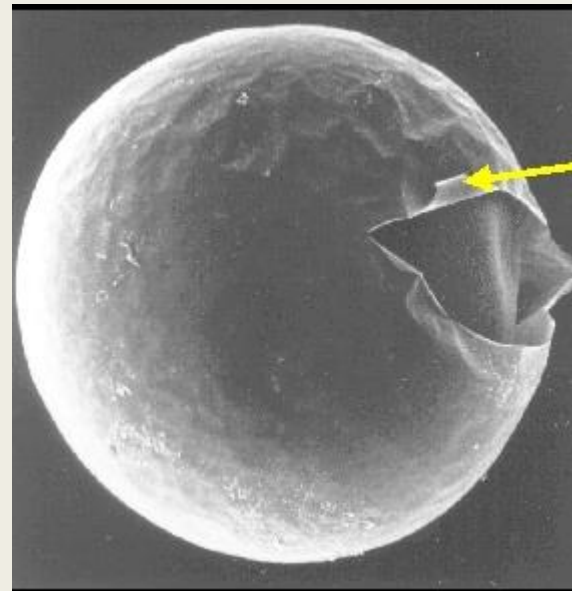
- *Nedochází k elongaci*
- *Migrace po celé děloze až do doby fixace*
 - 16-18 dní po fertilizaci



Mare

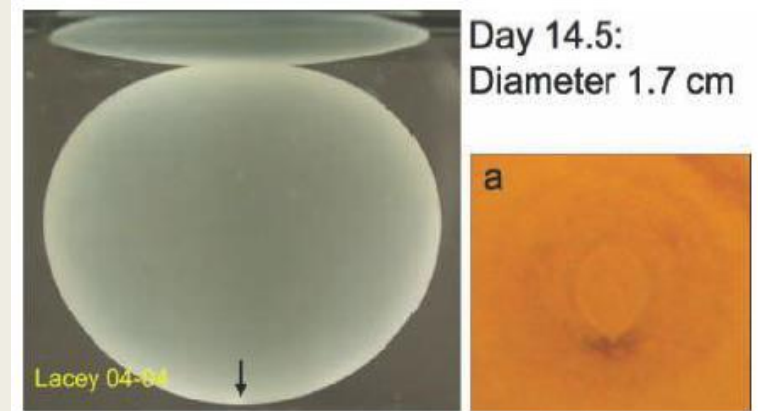
Nonpregnant

Pregnant



kapsula

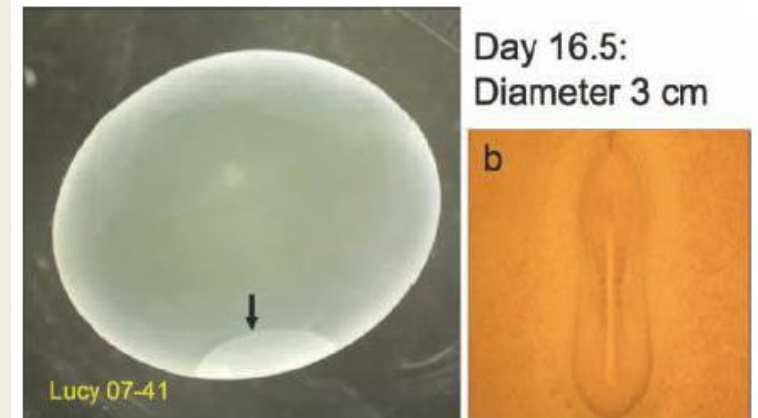
Velikost embrya a vztah k RDB



Day 14.5:
Diameter 1.7 cm

a

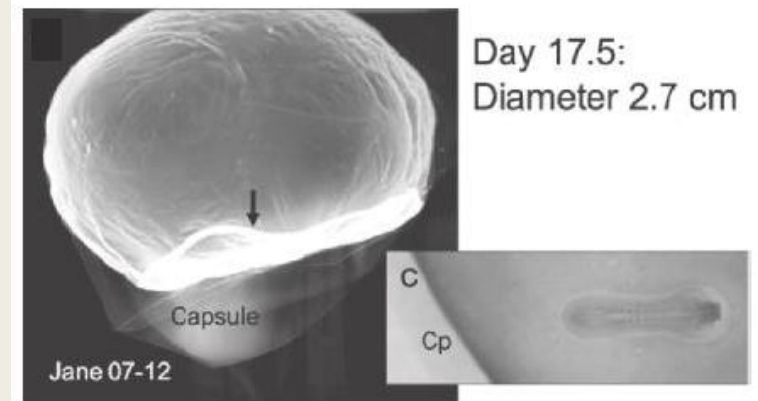
(a)



Day 16.5:
Diameter 3 cm

b

(b)



Day 17.5:
Diameter 2.7 cm

Capsule

C

Cp

Jane 07-12

Praktická veterinární embryologie

■ In vivo situace

- *Hospodářská zvířata: obrovský selekční tlak na reprodukční znaky*
 - Proto se řeší hlavně ovariální aktivita a načasování inseminace
 - *Vlivy zootechnické, zdravotní; výživa a management*
 - Krávy, prasnice, (klisny)

- *Domácí mazlíčci*
 - Psi, kočky, minoritně hlodavci, ptactvo
 - Embryo technologie naprosto minimálně využívány v chovu (klonování savců)
 - Spíše se řeší základní management samce a samice a využití inseminace

Praktická veterinární embryologie

■ In vitro situace

- *Krávy, klisny, ...*
 - Základem je management získávání oocytů
 - In vitro zpracování je obecně stejné (IVF, IVC) s rozdíly v „hodinách“ a složení médií

- *Záchrana ohrožených druhů*
 - Severní bílý nosorožec
 - *Leibniz Institute for Zoo and Wildlife Research (Leibniz-IZW), Safari Park Dvůr Králové, Kenya Wildlife Service and Ol Pejeta Conservancy*
 - *Avantea (Itálie)*

- *Zebry, antilopy, divoké kočky, ...*

IETS: International Embryo Technology Society

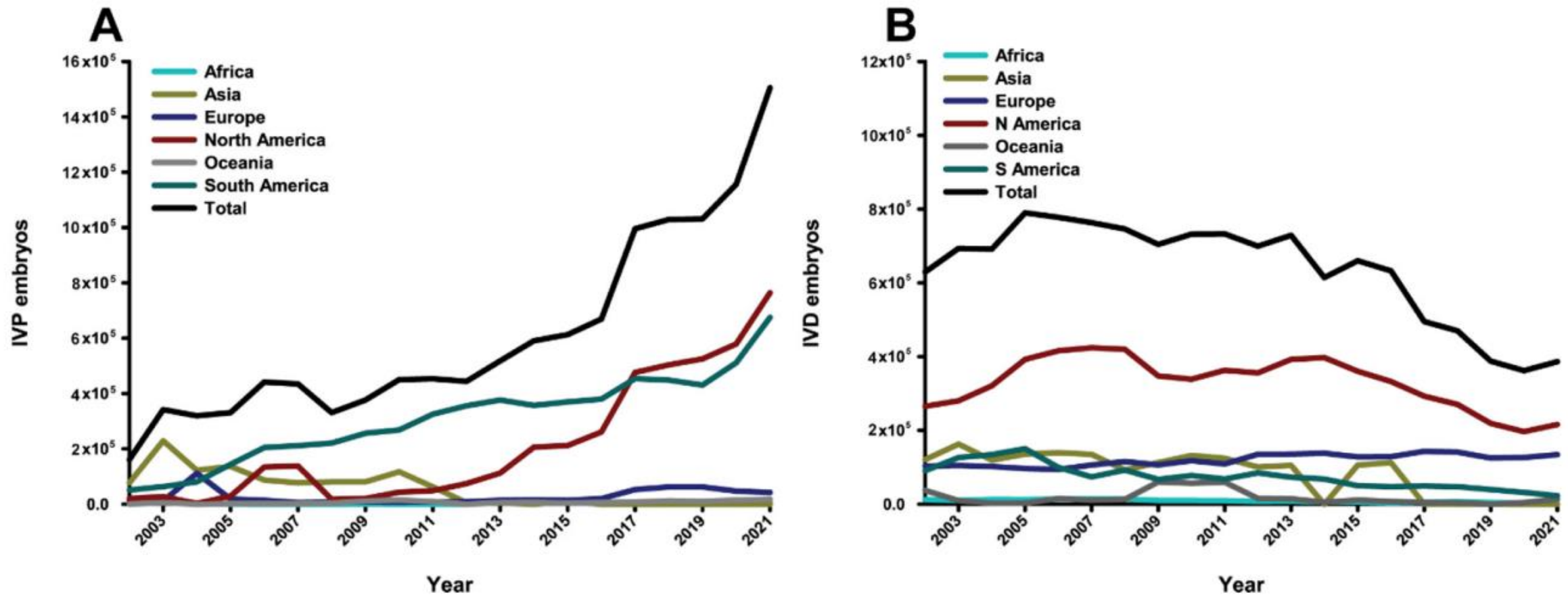


Figure 3. Number of embryos produced or collected in cattle in the period of 2002-2021, by continent. (A) *In vitro*-produced [IVP] embryos; (B) *In vivo*-derived [IVD] embryos.

Používané embryotechnologie v praxi

■ In vivo

- *Embryotransfer*

■ In vitro

- *IVPE*
 - Genomická testace

- *Klonování*
- *Genetické modifikace (SCNT)*
- *Sexace embryí*
- *Půlení embryí*

The image features two large, thick black L-shaped brackets. One is positioned in the top-left corner, and the other is in the bottom-right corner. They are oriented towards each other, framing the central text.

EMBRYOTRANSFER

Historie ET

Table 1.4 First successful (with the delivery of live offspring) embryo transfers in different species

Year	Author	Country	Species
1891	Heape	UK	Rabbit
1933	Nicholas	USA	Rat
1934	Warwick et al.	USA	Sheep
1942	Fekete and Little	USA	Mouse
1949	Warwick and Berry	USA	Goat
1951	Willett et al.	USA	Cattle
1951	Kvasnitski	UdSSR (Ukraine)	Pig
*1964	Mutter et al.	USA	Cattle
1968	Chang	USA	Ferret
1974	Oguri and Tsutsui	Japan	Horse
1976	Kraemer et al.	USA	Primate
1978	Steptoe and Edwards	UK	Human
1978	Shriver and Kraemer	USA	Cat
1979	Kinney et al.	USA	Dog

*Transcervical transfer

Chirurgické získávání a transfer E u Bo



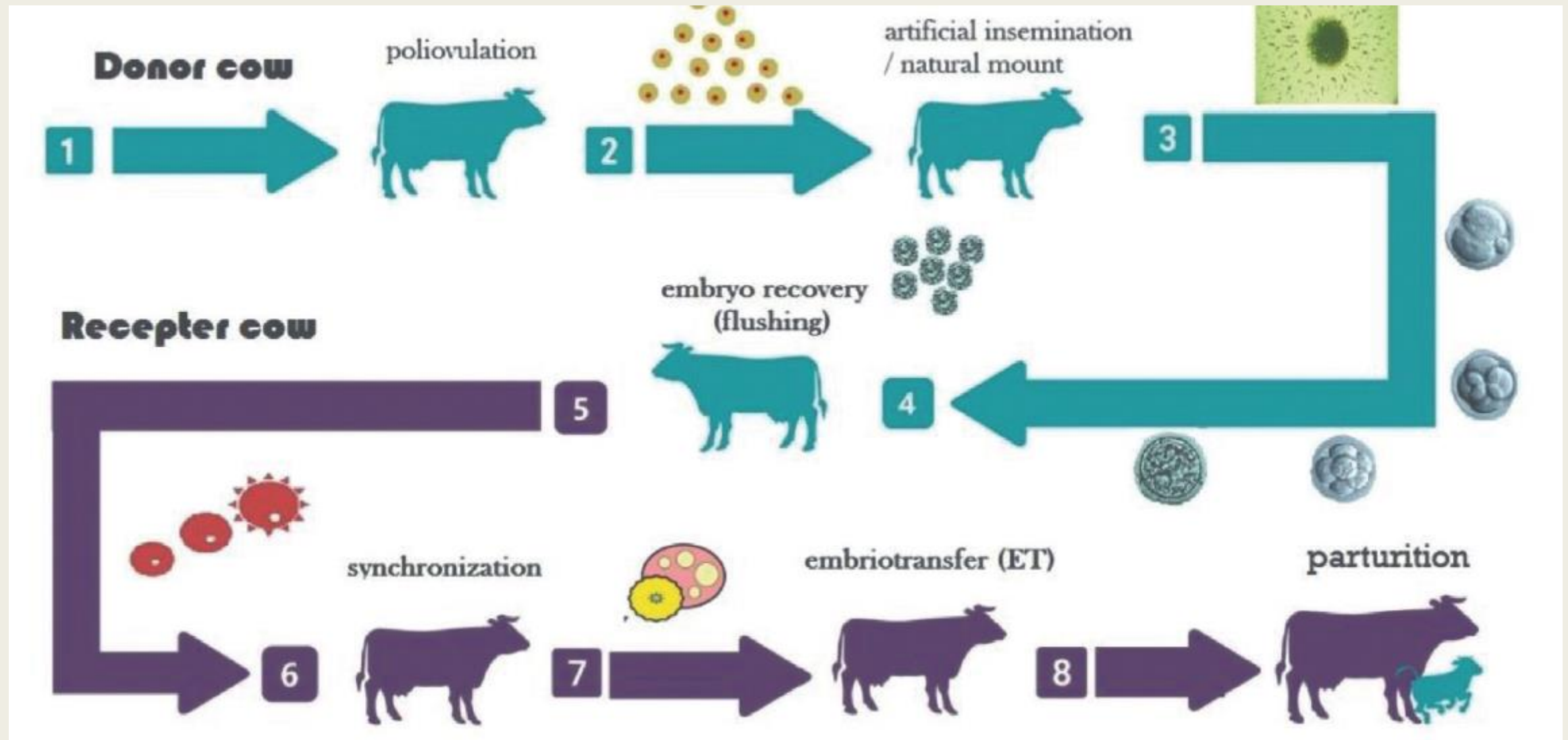
Figure 8.12. Cow under general anesthesia, prepared for mid-ventral surgical embryo recovery or transfer. Courtesy of G.E. Seidel, Jr.

Výběr dárkyně embryí

- „ET neudělá z průměrné krávy dobrou, nebo z dobré lepší.“
- ET zasahuje do procesu reprodukce a šlechtění převážně vysokoužitkových jedinců
- Cíl je produkce více potomstva od vynikajících rodičovských párů, zkrácení generačního intervalu a také např. tvorba a udržení zajímavých linií
- Získaná embrya od vysokoužitkových krav lze přenést do jalovic s nižší plemennou hodnotou
- Zvýšení příjmů za prodej embryí
- Zisk embryí pro
 - *Genomické testování*
 - *Půlení embryí*



Fáze embryotransferu



ET harmonogram


- Jednotlivé kroky stejně důležité!!
- Konzervativní aplikační schéma
 - 8 injekcí během 4 dní

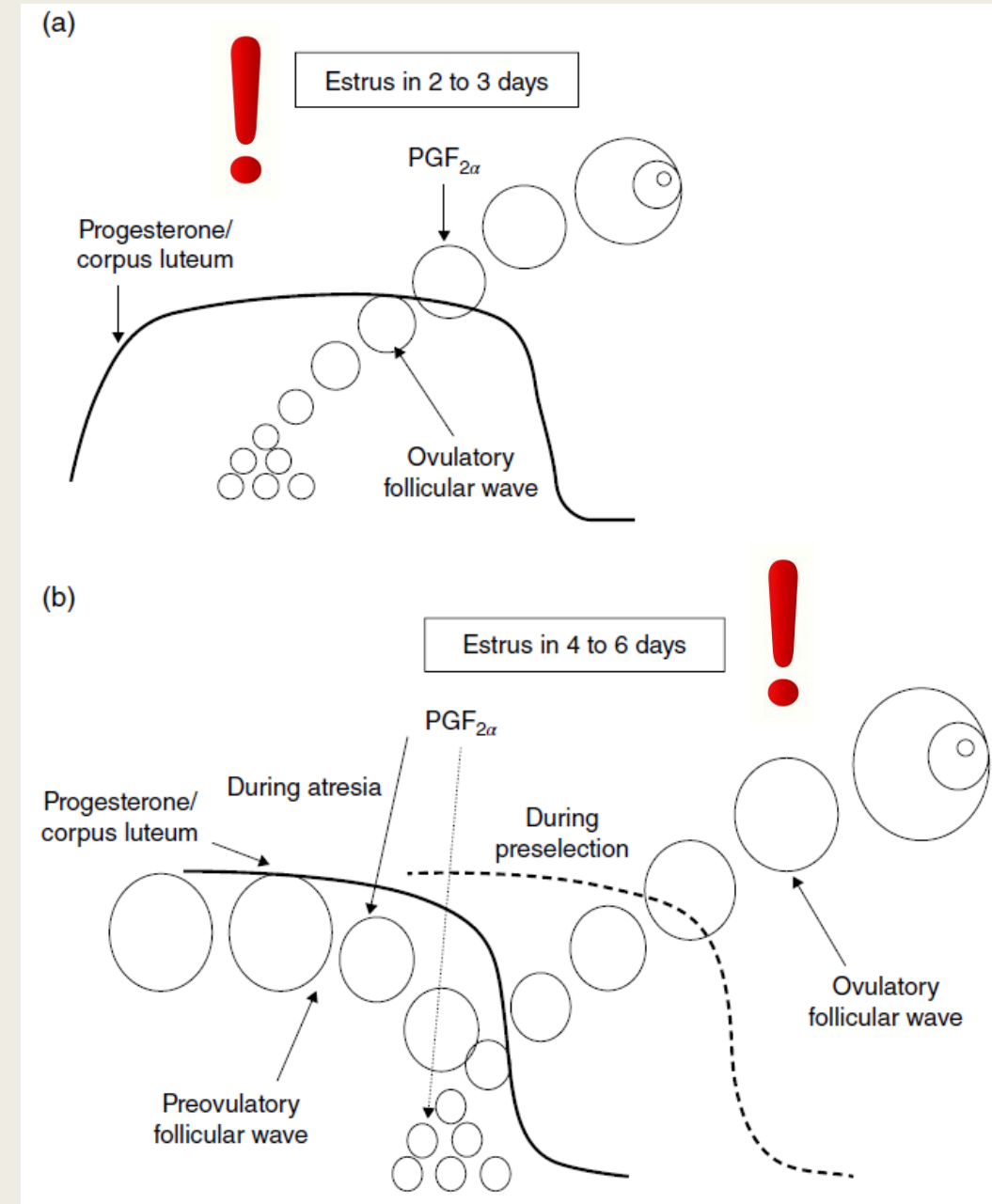
I.					
Chovatel		Mnětice - Wagyu			
	Úkon	Dávkování a časový rozpis		Základní schéma na CL 10. den	
Dárkyně					
1.	Aplikace Oestrophanu (OE)	3 ml		čtvrtek 5. září 2024	
2.	Aplikace Oestrophanu (OE)	3 ml		pondělí 16. září 2024	
3.	Kontrola říje - SUPERGESTRAN	4 ml		čtvrtek 19. září 2024	
4.	VYŠETŘENÍ CL (corpus luteum)			neděle 29. září 2024	
		Ráno: 6-8 hod.	Večer: 18-20 hod.		
5.	Aplikace Plusetu	2 ml	2 ml	neděle 29. září 2024	
6.	Aplikace Plusetu	1,5 ml	1,5 ml	pondělí 30. září 2024	
7.	Aplikace Plusetu + OE (3ml)	1 ml + OE	1 ml	úterý 1. říjen 2024	
8.	Aplikace Plusetu	0,5 ml		středa 2. říjen 2024	
9.	Inseminace	celkem 2x	(8-10 hod.)	18-20 hod.	čtvrtek 3. říjen 2024
10.	Inseminace		7-9 hod.	(14-16 hod.)	pátek 4. říjen 2024
11.	ODBĚR EMBRYÍ	1000 ml transfermedium, 5 ml OE		čtvrtek 10. říjen 2024	
Příjemkyně					
1.	Gynekologické vyšetření				
2.	Aplikace Oestrophanu I.	3 ml		čtvrtek 19. září 2024	
3.	Aplikace Oestrophanu II.	3 ml		pondělí 30. září 2024	
4.	Kontrola říje (individuálně)			čtvrtek 3. říjen 2024	
5.	PŘENOS EMBRYÍ			čtvrtek 10. říjen 2024	

2 aplikace FSH místo 8

Úkon		Dávkování a časový rozpis		Základní schéma na CL 10. den	
Dárkyně					
1.	Aplikace Oestrophanu (OE)	3 ml		čtvrtek 24. říjen 2024	
2.	Aplikace Oestrophanu (OE)	3 ml		pondělí 4. listopad 2024	
3.	Kontrola říje + SPG	2 ml		čtvrtek 7. listopad 2024	
4.	VYŠETŘENÍ CL (corpus luteum)			neděle 17. listopad 2024	
		Ráno: 6-8 hod.	Večer: 18-20 hod.		
5.	Aplikace Plusetu	7,5 ml		neděle 17. listopad 2024	
6.				pondělí 18. listopad 2024	
7.	Aplikace Plusetu + OE (3ml)	2,5 ml + OE		úterý 19. listopad 2024	
8.				středa 20. listopad 2024	
9.	Inseminace	celkem 2x	(8-10 hod.)	18-20 hod.	čtvrtek 21. listopad 2024
10.	Inseminace		7-9 hod.	(14-16 hod.)	pátek 22. listopad 2024
11.	ODBĚR EMBRYÍ	1000 ml transfermedium, 5 ml OE		čtvrtek 28. listopad 2024	
Příjemkyně					
1.	Gynekologické vyšetření				
2.	Aplikace Oestrophanu I.	3 ml		čtvrtek 7. listopad 2024	
3.	Aplikace Oestrophanu II.	3 ml		pondělí 18. listopad 2024	
4.	Kontrola říje (individuálně) + SPG	2 ml		čtvrtek 21. listopad 2024	
5.	PŘENOS EMBRYÍ			čtvrtek 28. listopad 2024	

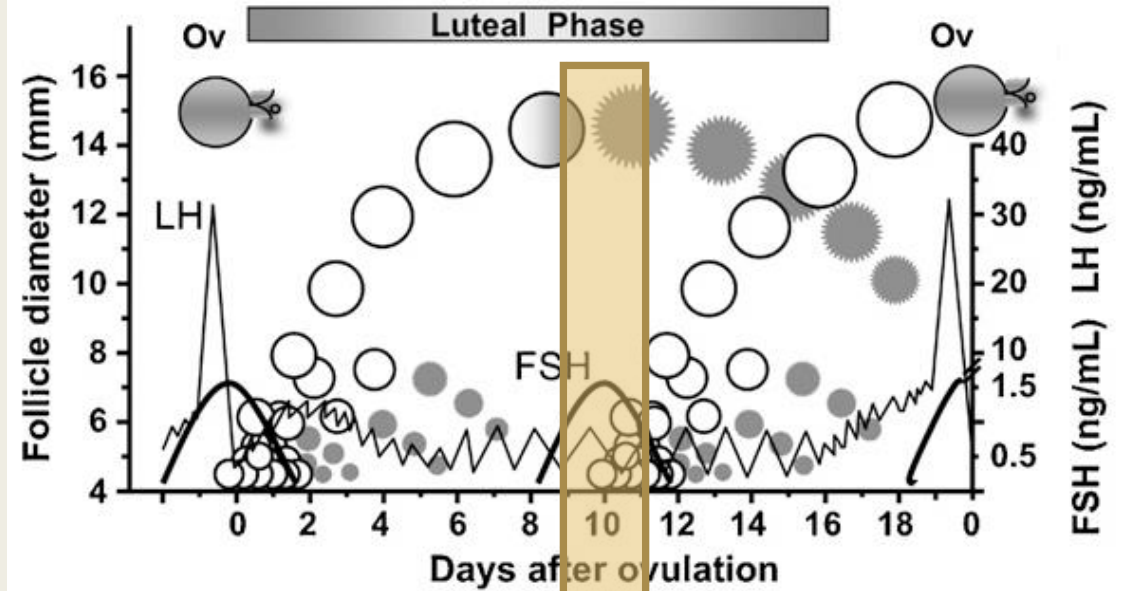
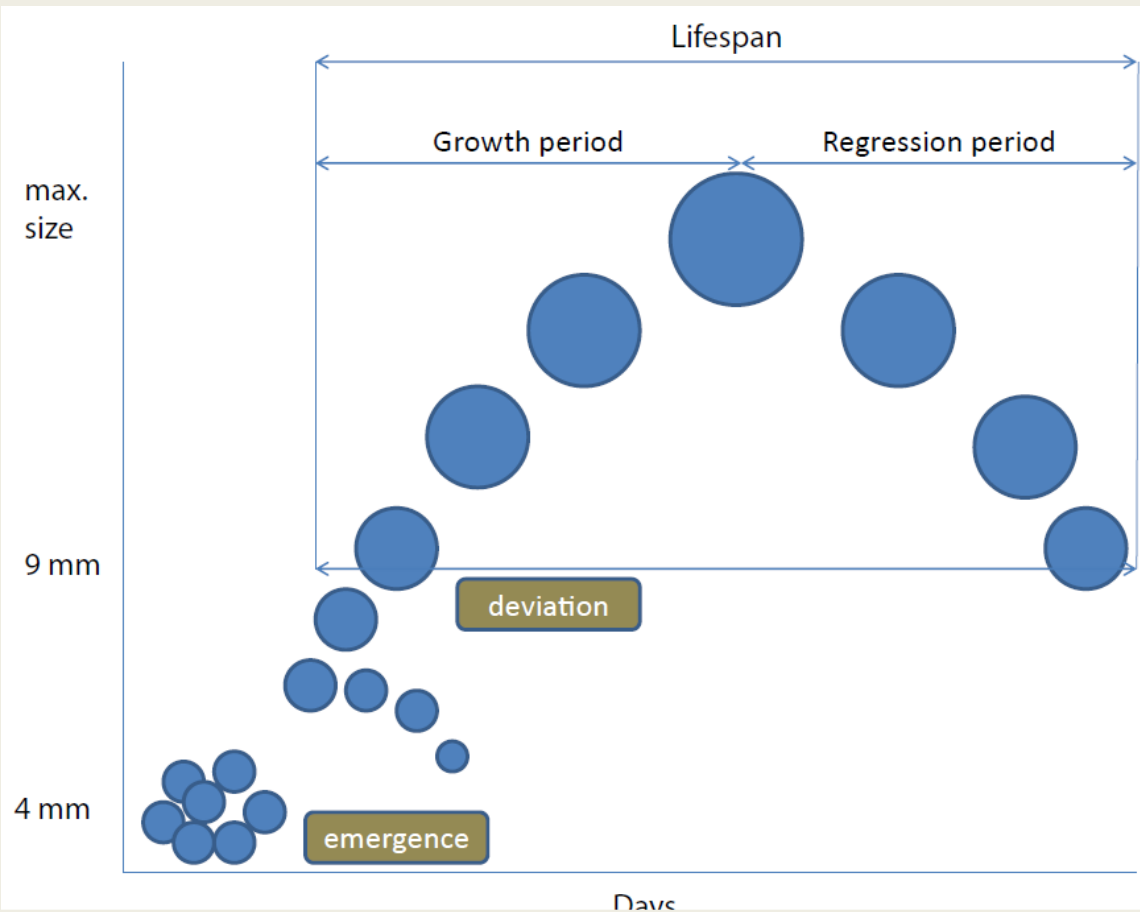
Příprava dárkyně

- Předchází vlastní aplikaci „superovulačních“ hormonů (FSH a LH)
 - Důvod: aplikaci FSH a LH musíme načasovat do určité fáze folikulární vlny
 - *bez velkých folikulů*
 - Používají se analogy PGF2alfa
 - *Rozmezí 1. a 2. aplikace: 14 dní, po druhé aplikaci kontrola říje*
- 
- *PROTOŽE NEMUSÍ NASTAT ZA 3 DNY!!!*

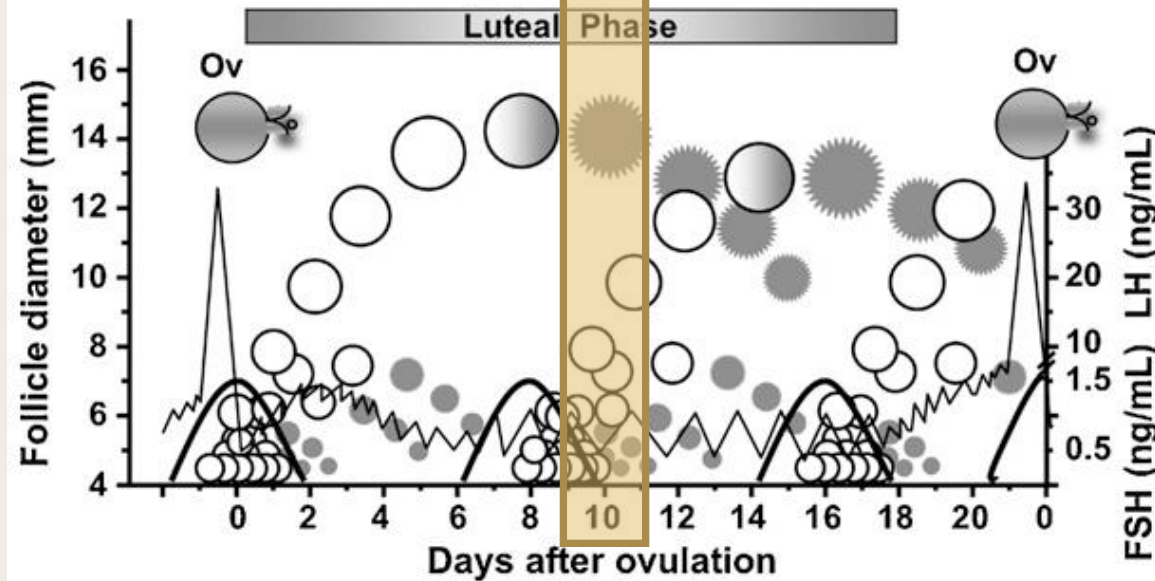


Superovulace

- Některé krávy reagují dobře, jiné ne
 - *Cca 80 % reaguje*



3-wave interovulatory interval



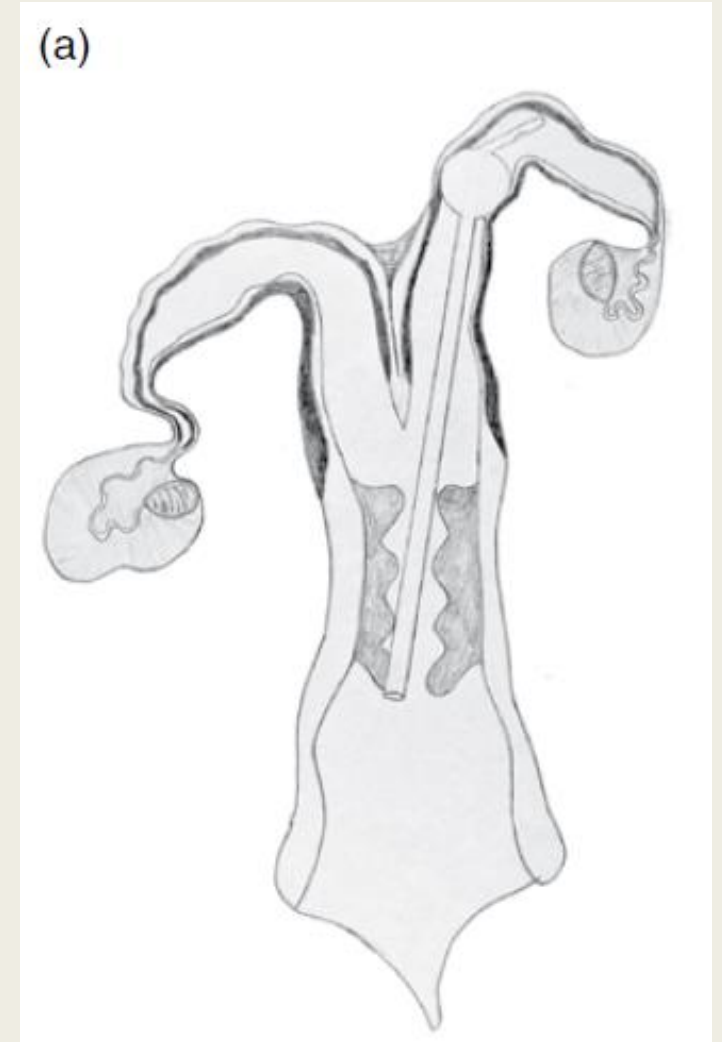
Výplach embryí z děložního rohu

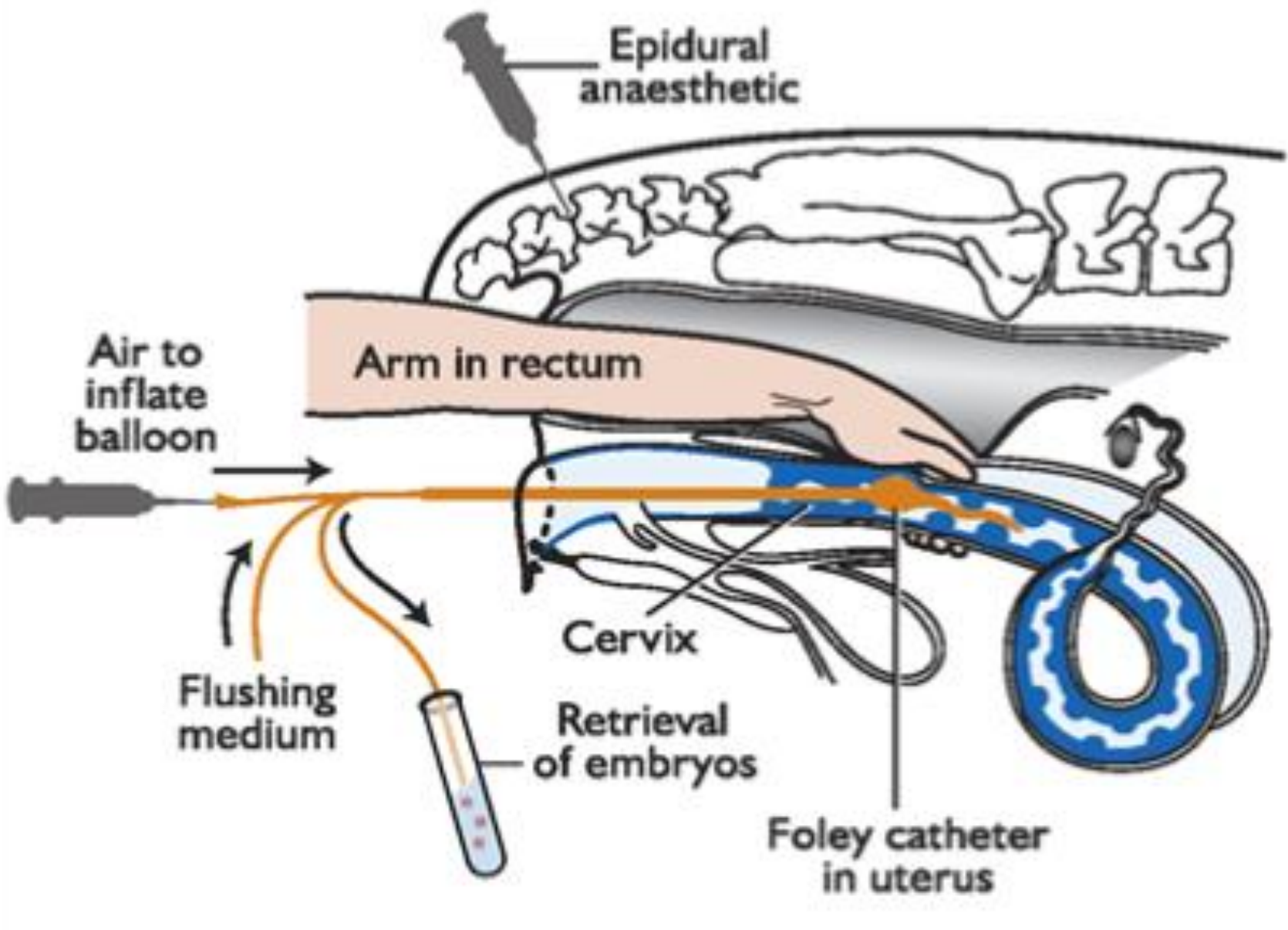


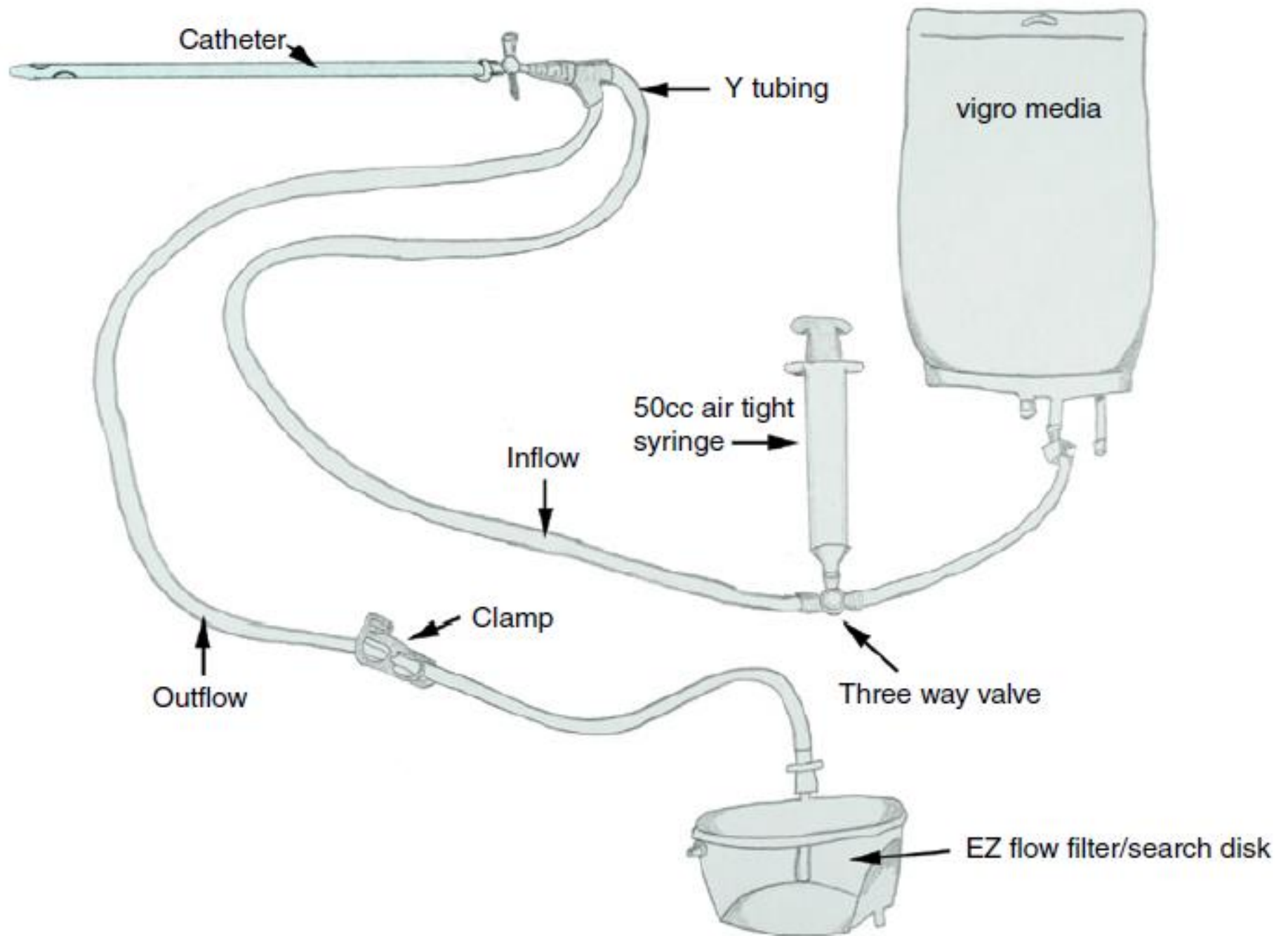
- Nechirurgický zákrok pod lokální anestezí
- Použití sterilních, jednorázových pomůcek, embryonálních filtrů
- Synteticky vyrobených vyplachovacích médií s přídavkem ATB
- Atraumatický proces trvající co nejkratší dobu s co největším efektem vybavení embryí z rohů děložních
- Ošetření dárkyně po odběru

Výplach embryí z děložního rohu

- 6,5-7 dní po „standind heat“
- Před vlastním výplachem vyšetření vaječnicků
- Dárkyně s 1 – 2 CL se zpravidla nevyplachují
- Fixování dárkyně
- Zavedení katetru krčkem dělohy do děložního rohu kde se fixuje nafouknutým latexovým balonkem





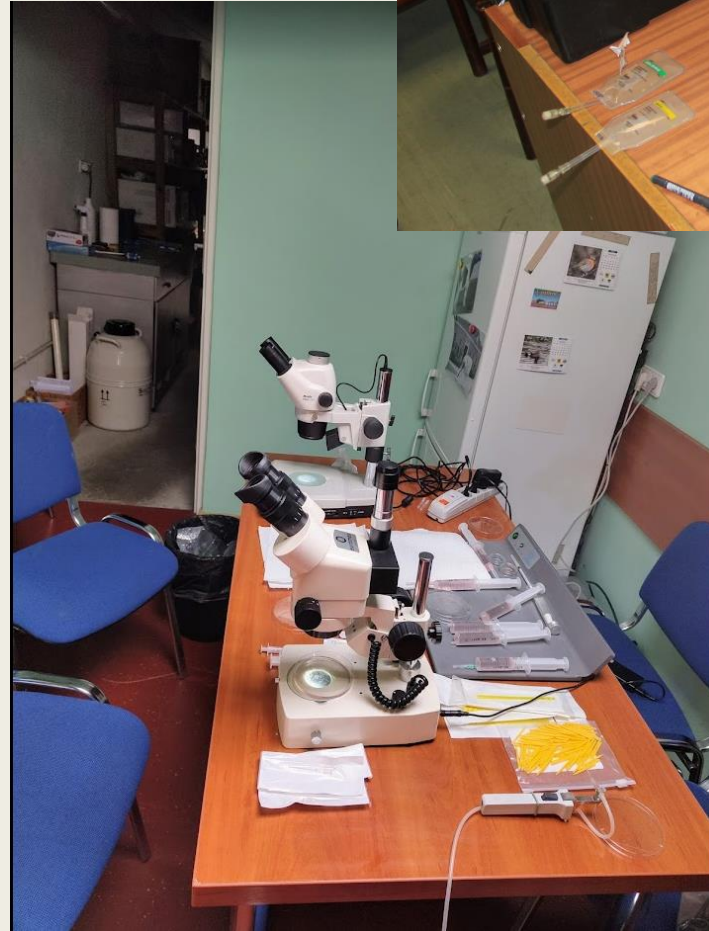




Výplach systémem „dovnitř“ a „ven“

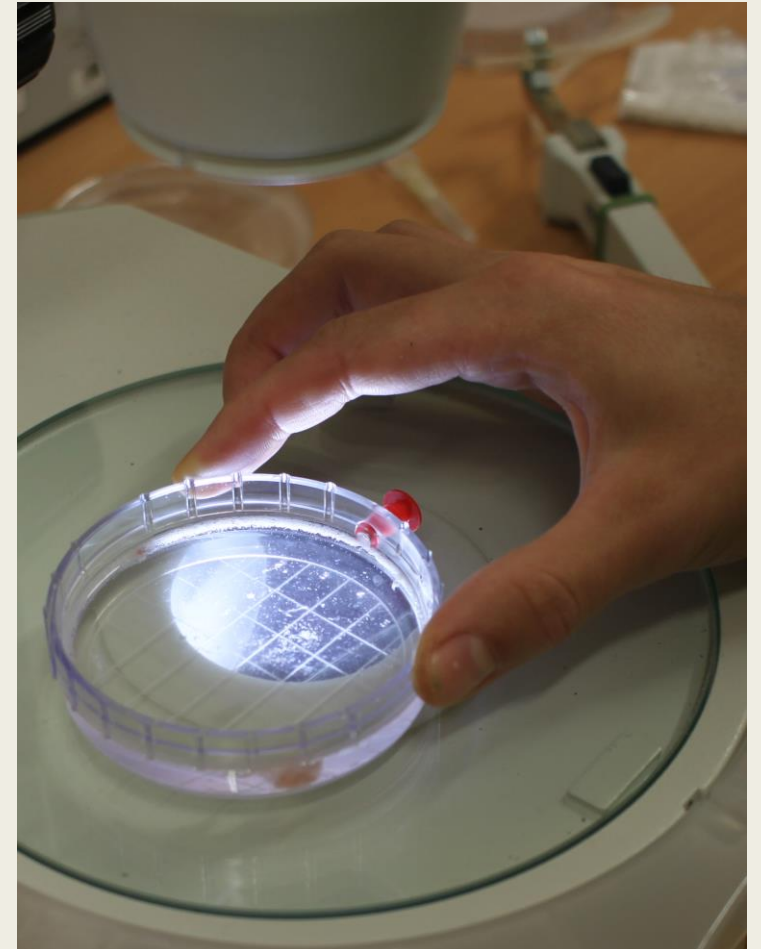
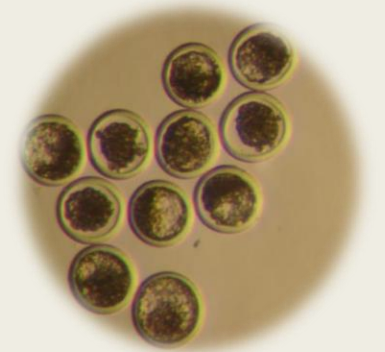


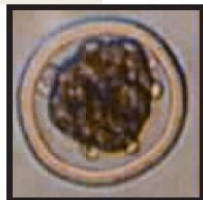
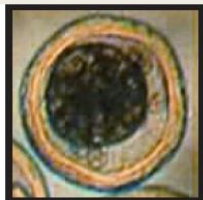
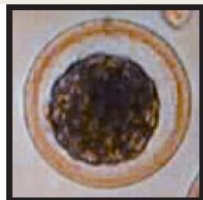
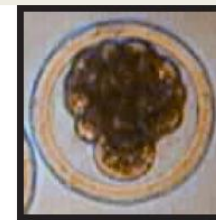
„Laboratorní čistota“



Třídění a klasifikace embryí

- Dle IETS
- Použití binokulární lupy se zvětšením 16x (vyhledávání) – 60x (hodnocení)
- Neoplozené oocyty
- Degenerovaná embrya
- Embrya s různým podílem odloučených buněk (1,2,3,4)
- Embrya v různém vývojovém stupni (4,5,6,7)
- Ošetření povrchu zona pellucida opakovaným oplachem v trypsinu





Cycle day: 6.5
Stage Code: 3
Quality Code: 1

Cycle day: 6.5
Stage Code: 3
Quality Code: 2

Cycle day: 6.5
Stage Code: 3
Quality Code: 2

Cycle day: 6.5
Stage Code: 4
Quality Code: 1

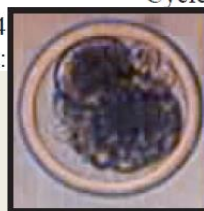
Cycle day: 7
Stage Code: 4
Quality Code: 1

Cycle day: 7
Stage Code: 4
Quality Code: 1

Cycle day: 7
Stage Code: 4
Quality Code: 1

Cycle day: 7
Stage Code: 4
Quality Code: 1

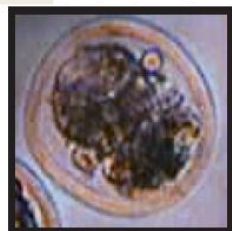
Cycle day: 7



Cycle day: 7
Stage Code: 4
Quality Code: 2

Cycle day: 7
Stage Code: 4
Quality Code: 2

Cycle day: 7
Stage Code: 4
Quality Code: 2

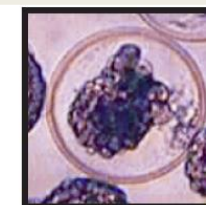
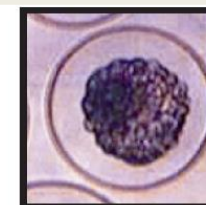
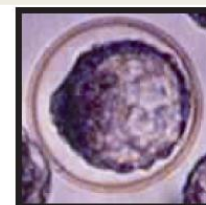
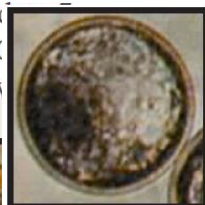


Cycle day: 7
Stage Code: 4
Quality Code: 2

Cycle day: 7
Stage Code: 4
Quality Code: 3

Cycle day: 7
Stage Code: 4
Quality Code: 3

Cycle day: 7
Stage Code: 4
Quality Code: 3



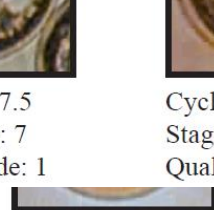
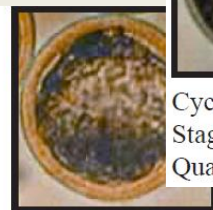
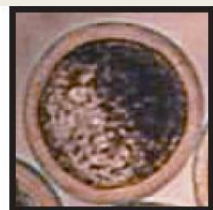
Cycle day: 7.5
Stage Code: 7
Quality Code: 1

Cycle day: 7.5
Stage Code: 7
Quality Code: 1

Cycle day: 7.5
Stage Code: 7
Quality Code: 1

Cycle day: 7.5
Stage Code: 7
Quality Code: 1

Cycle day: 7.5
Stage Code: 7
Quality Code: 2



Cycle day: 7
Stage Code: 5
Quality Code: 3

Cycle day: 7
Stage Code: 6
Quality Code: 1

Cycle day: 7.5
Stage Code: 6
Quality Code: 1

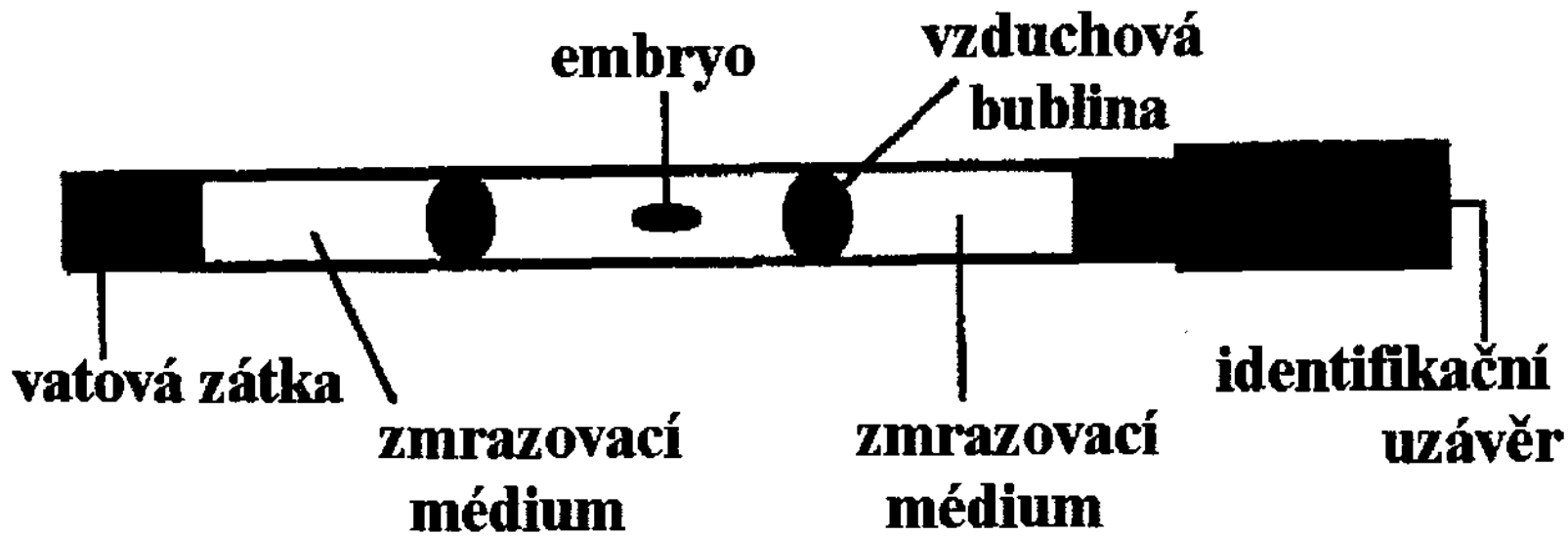
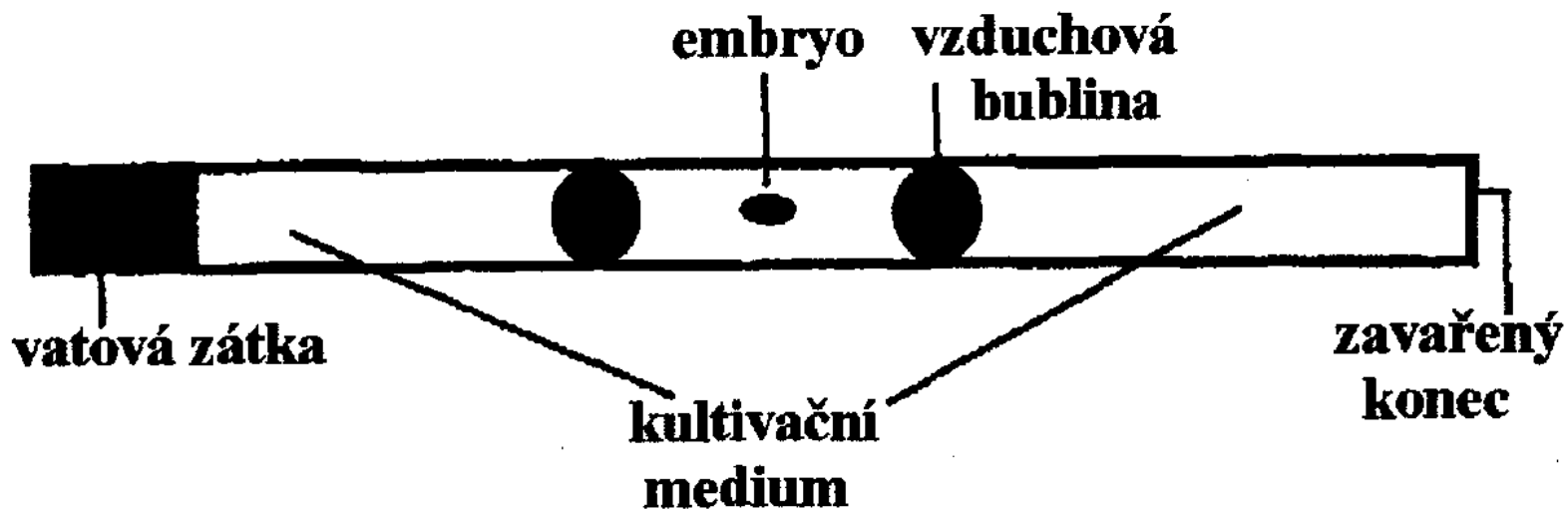
Cycle day: 7.5
Stage Code: 6
Quality Code: 1

Cycle day: 7.5
Stage Code: 6
Quality Code: 2

Konzervace embryí



- Krátkodobé uchování při řízené teplotě – Holding medium (2-4! hodiny při pokojové teplotě)
- Kryokonzervace hlubokým mražením na -196°C dlouhodobá konzervace
 - *1,5M EthylenGlycol*
 - *10% Glycerol*
- Vitřifikace ?

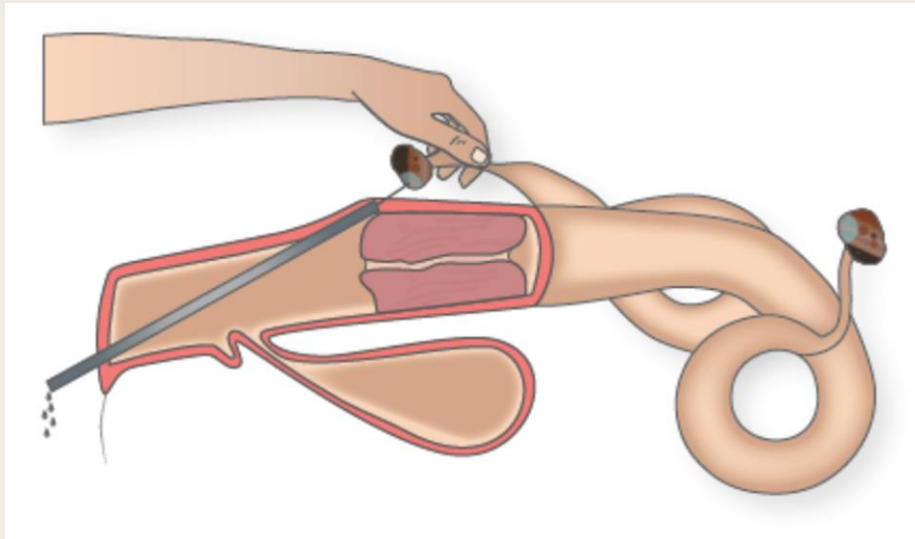


Úspěšnost výplachu embryí

- Asi 20 % dárkyň nereaguje na hormonální léčbu
- Klíčový aspekt: superstimulační odpověď vaječníků dárkyně
- Variabilita v odpovědi na superstimulaci studována z pohledu:
 - *Vyrobená várka FSH a LH*
 - *Poměr FSH/LH*
 - *Délka trvání podávání FSH a LH*
 - *Načasování jednotlivých injekcí*
 - *Místo depozice hormonů*
 - ...
- **Zásadní je ale načasování aplikace z pohledu vývoje folikulární vlny**

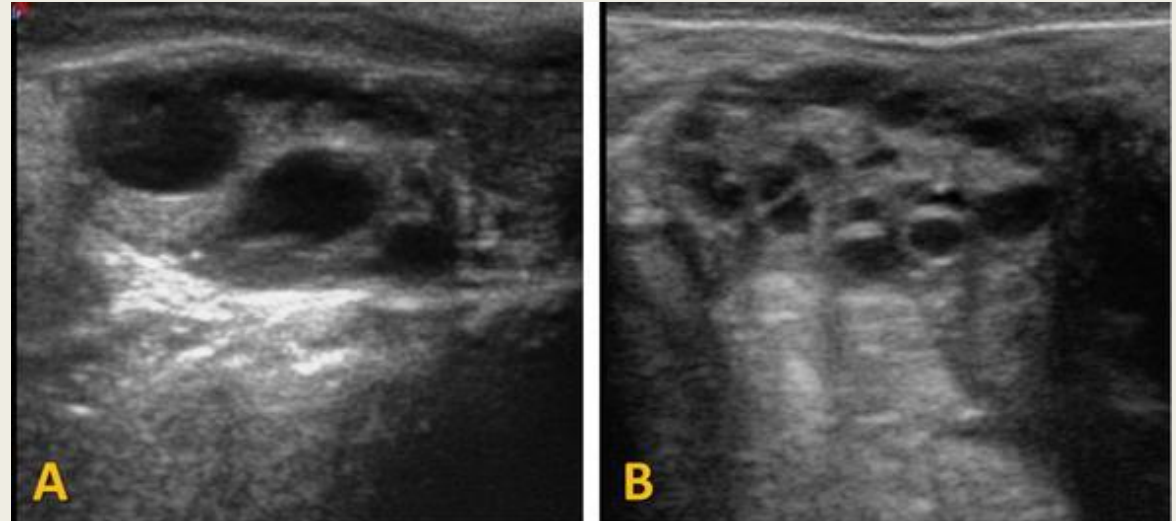
Odstranění DF

- Dva největší folikuly; nebo vše > 5 mm
- Začátek hormonální stimulace 1-2 dny po
- Lepší výsledek superovulace
- Některé práce zmiňují podobné počty přenosuschopných embryí




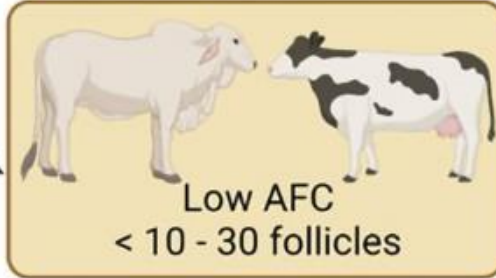
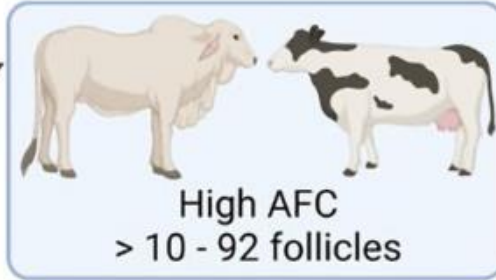
Počet antrálních folikulů (AFC)

- Celkový počet antrálních folikulů na vaječníku v určitém čase
- Sčítají se folikuly viditelné pomocí ultrazvuku na obou vaječnicích
 - $>2-3 \text{ mm}$
- I když ovlivněné jednotlivcem, stádiem cyklu, kondicí a nutričním stavem
 - *Opakovatelnost měření překvapivě vysoká: 0,8-0,9*
- Řadí se mezi nejlepší prediktor superovulační odpovědi
 - *Krávy s vyšším AFC produkují více embryí*
- Heritabilita
 - *0,3 u dojených krav*
 - *0,25 u jalovic*





Ultrasound
determination
of AFC




Oocyte & Embryonic Fertility

↑ follicular vasculature, blastocyst rates,
hatched blastocyst rates, 12 day
embryonic cell growth, cleavage rates

↓ embryonic apoptotic cells

Cow Fertility


↑ % of heifers cycling at 15 months,
pregnancy rate, conception rate,
progesterone concentration



↓ days to conception

Cow Fertility ♀

↑ pregnancy rate, conception rate,
progesterone concentration



Oocyte & Embryonic Fertility

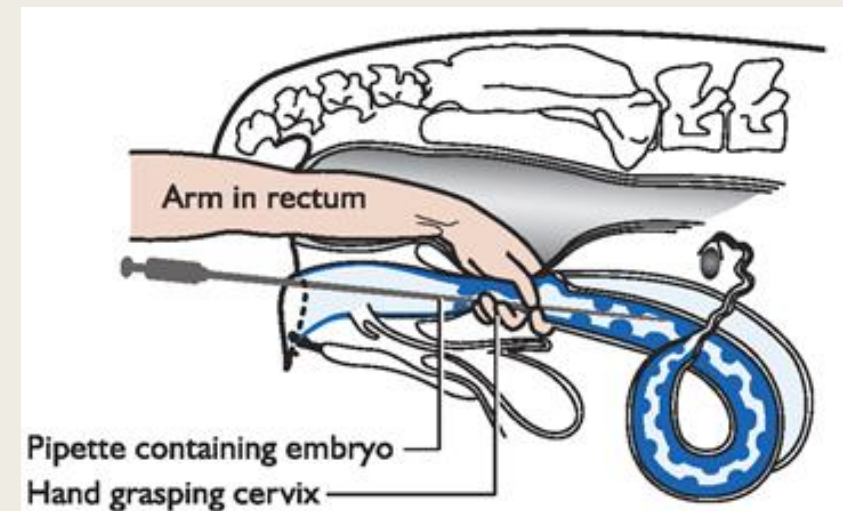
↑ preovulatory follicular blood flow,
blastocyst cell #, CL area

Výběr příjemkyně

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

Přenos embryí

- Nechirurgický, atraumatický přenos embrya do děložního rohu s detekovaným CL
- Přesnost, šetrnost, rychlost
- U konzervovaných embryí to platí dvojnásob (rychlost- DT)
- Kvalita embryí NE vždy přímo koresponduje s úspěšností zabřezávání
- Přenos čerstvých a konzervovaných embryí stejné kvality cca – 10% zabřezlých









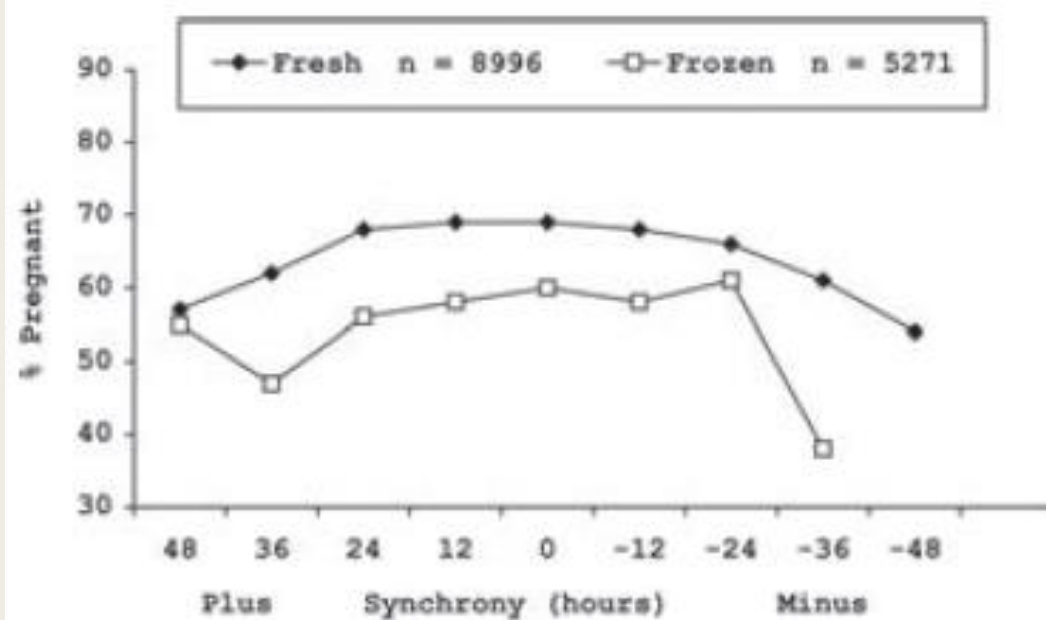


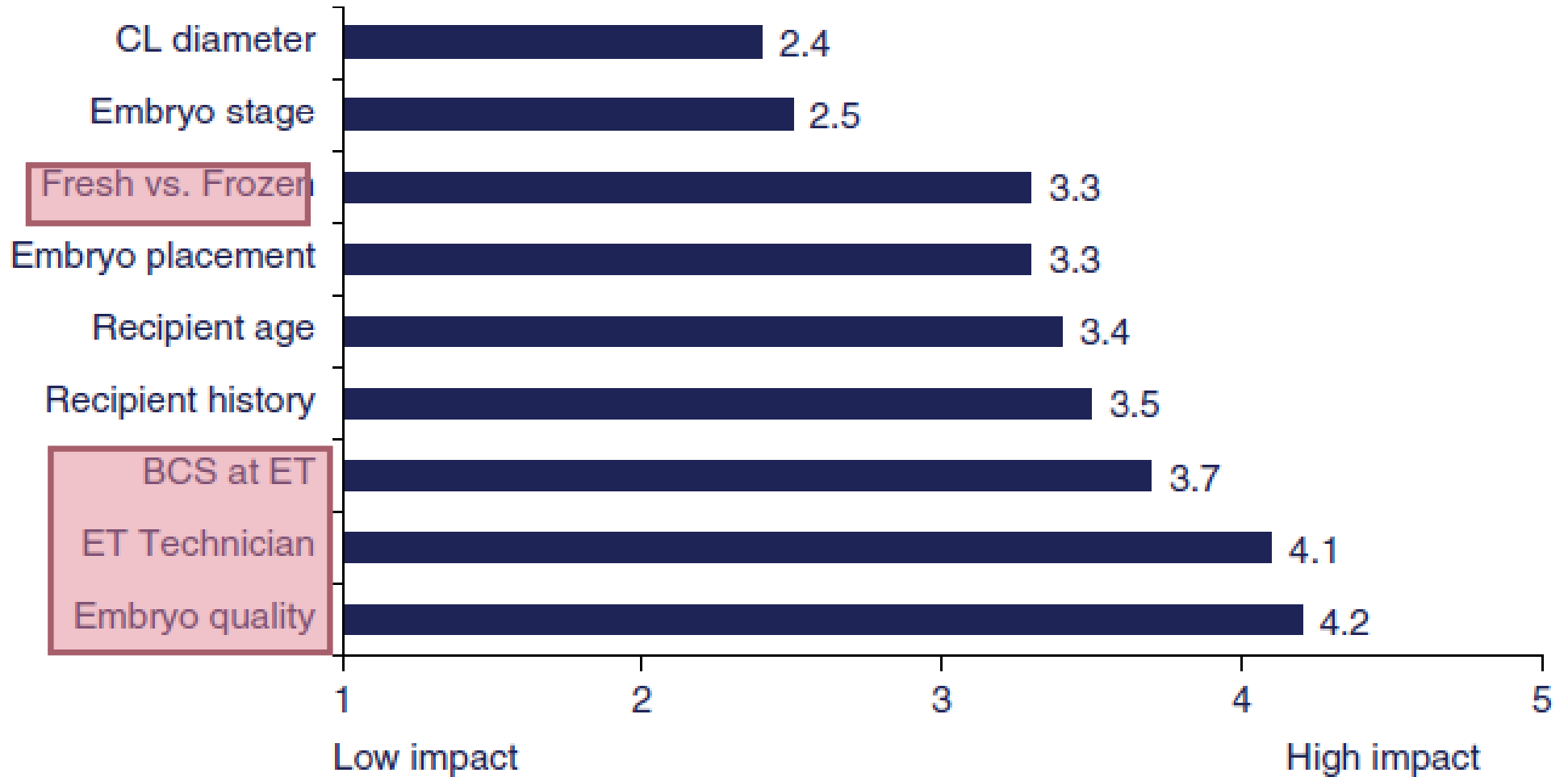
Figure 8.13. Effect of synchrony between bovine embryo age and recipient estrus on the pregnancy rate of recipients following transfer of fresh or frozen-thawed embryos. Plus asynchrony = recipient in estrus before donor; minus asynchrony = recipient in estrus after donor. Courtesy of Hasler, 2001.

Embryo grade	Fresh		Frozen	
	No. transfers	% pregnant	No. transfers	% pregnant
1 (excellent)	4,163	73 ^a	2,482	63 ^a
2 (good)	3,156	68 ^b	2,329	57 ^b
3 (fair)	1,641	56 ^c	454	44 ^c
4 (poor)	61	48 ^c	22	36 ^{b,c}
Embryo stage				
M	5,633	67	3,576	58
EB	1,978	70	1,140	61
MB	995	71	478	58
XB	391	71	93	51
HB	25	56	—	—

^{abc}Values in columns without common superscripts vary significantly ($P < 0.05$). (Hasler, 2001).

M = morula, EB = early blastocysts, MB = mid blastocyst, XB = expanded blastocyst, HB = hatched blastocyst.

Co ovlivňuje zabřezávání po přenosu?



Zabřezávání po ET

Čerstvá embrya (9023 ks)

■ 68,3 %

Kryokonzervace (5297 ks)

■ 58,4 %

<u>Year</u>	Fresh		Frozen	
	No. Transfers	% Pregnant	No. Transfers	% Pregnant
1987	2512	68.6	1174	61.3
1988	2716	67.3	1290	58.5
1991	1960	70.1	1479	57.5
1992	1835	67.2	1354	56.7

Přenos embrya u přebíhalek?

Table 1. Conception rate in repeat breeder cows after AI or ET

Author	Conception rate		Comments
	AI	ET	
Tanabe <i>et al.</i> 1985 (65)	-	70%	fresh embryos transferred surgically
Rodrigues <i>et al.</i> 2007 (52)	17.9%	41.7%	frozen-thawed embryos
Son <i>et al.</i> 2007 (61)	heat 7.7% vs TAI 18.5%	53.8%	frozen-thawed embryos; TET with CIDR and EB
Dochi <i>et al.</i> 2008 (16)	20.4%	41.5%	frozen-thawed IVF embryos following AI
Block <i>et al.</i> 2010 (7)	TAI 31.3%	50.5% vs 27.7%	fresh embryos vs vitrified embryos (<i>in vitro</i>); TET
Rodrigues <i>et al.</i> 2010 (53)	-	42.9% vs 38.2%	frozen-thawed embryos; TET with norgestomet implant and eCG (cows with or without CL on day 0 of the protocol)
Canu <i>et al.</i> 2010 (11)	30.0%	52.6%	frozen-thawed embryos (92%) and fresh embryos (8%) following AI after natural heat
Yaginuma <i>et al.</i> 2019 (71)	-	46.9%	frozen-thawed IVF embryos following AI

AI – artificial insemination; CIDR – controlled internal drug release; CL – corpus luteum; EB – estradiol benzoate; eCG – equine chorionic gonadotropin; ET – embryo transfer; IVF – *in vitro* fertilisation; TAI – timed artificial insemination; TET – timed embryo transfer

Orientační finanční náklady ET

Dárkyně

- Prostaglandiny: cca 300
- Superovulační hormony – Pluset: cca 9600 (1 dárkyně 4800)
- Inseminace: 300 2x, 600 4x
- Výplach: 1000
- Vyplachovací médium: 700
- Kryokonzervace embrya: 700

Příjemkyně

- Prostaglandiny: cca 250 – 300
- Přenos embrya: 600

ceny bez DPH

Průměrně se vypláchne 5 přenosuschopných embryí

1x dárkyně = 7400

5x příjemkyně = 4500

Orientační finanční náklady ET - zahraničí

Champion Genetics	Dolar	CZK
Dárkyně		
Synch. a superovulace	290	6960
Výplach	250	6000
Insem.	50	1200
Embryo 65x5	325	7800
		21960
Příjemkyně (5x)		
Synchronizace	225	5400
Přenos	375	9000
		14400

Hurkmans (NL)	EUR	CZK
Dárkyně		
bez léků!!!!		
Výplach	295	7670
Kryo za 5 ks (<10 ks)	162,5	4225
		11895
Příjemkyně (5x)		
bez léků!!!		
Přenos	275	6600
		6600

A decorative frame consisting of thick black lines forming an L-shape. One line runs vertically down the left side, and another runs horizontally across the top. A second L-shaped line is positioned at the bottom right, mirroring the first one.

LABORATORNÍ PRODUKCE EMBRYÍ

IETS: International Embryo Technology Society

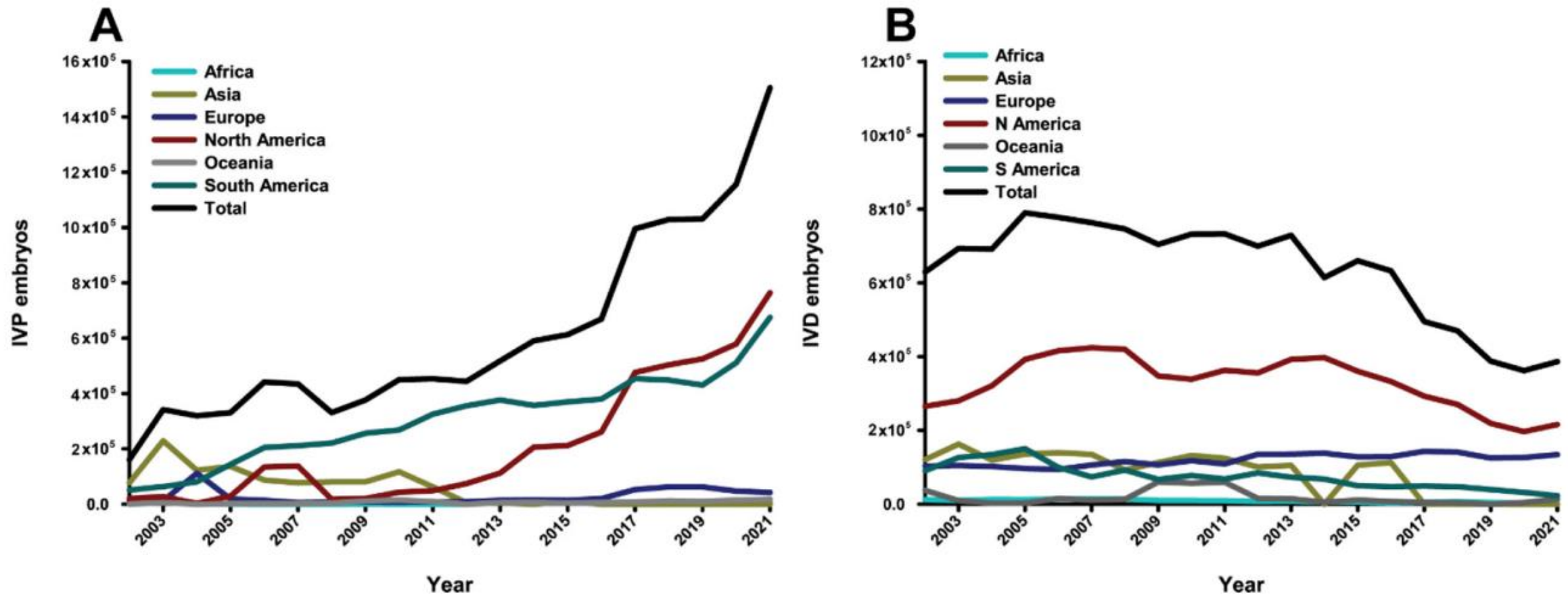


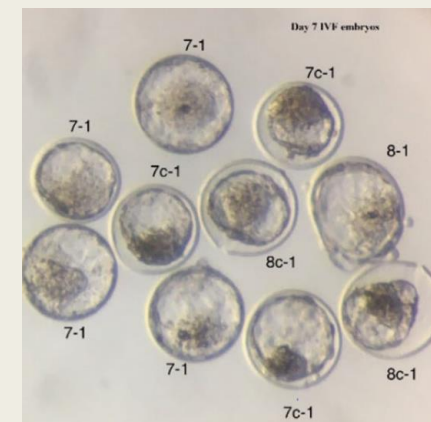
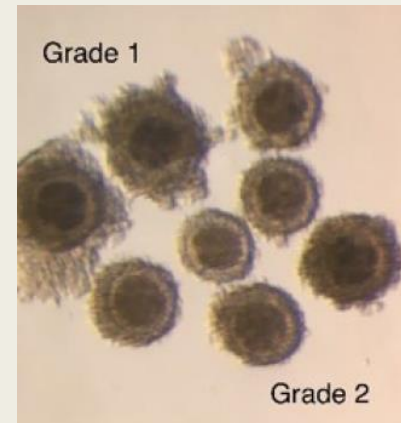
Figure 3. Number of embryos produced or collected in cattle in the period of 2002-2021, by continent. (A) *In vitro*-produced [IVP] embryos; (B) *In vivo*-derived [IVD] embryos.

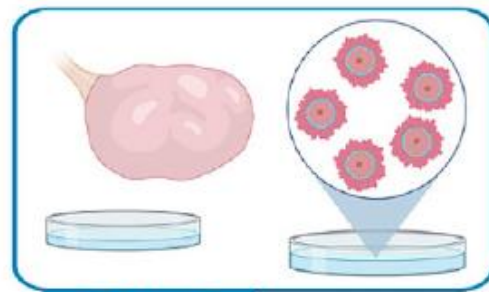
In vitro produkce embryí

- časově, finančně a technicky náročná procedura
- zahrnuje několik na sebe navazujících kroků



- výběr dárkyně
- sedace a fixace
- sběr oocytů
- **in vitro zrání**
- **in vitro fertilizace**
- **in vitro kultivace embryí**
- přenos nebo kryokonzervace





Day -1

***In vitro* Maturation**

Collect ovaries, prepare, and mature oocytes

Steps
1-5



Day 0 or 1

***In vitro* Culture Preparation**

Prepare media dishes and hypoxia chamber

Step 9

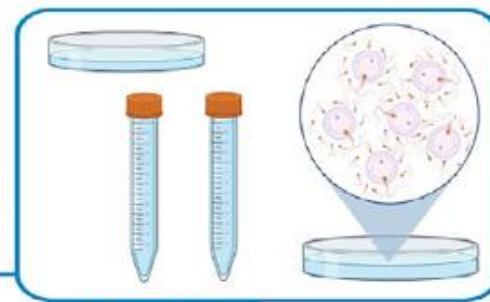


Day 2

Cleavage Assessment

Record embryo cleavage

Step 11



Day 0

***In vitro* Fertilization**

Prepare and fertilize

Steps
6-8

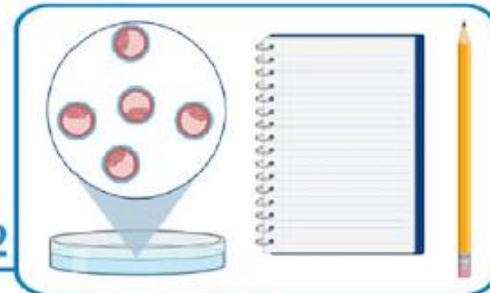


Day 1

***In vitro* Culture**

Denude and culture presumptive zygotes

Step 10



Day 7 & 8

Blastocyst Assessment

Record embryo blastulation

Step 12

Jakou dárkyni vybrat?

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



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

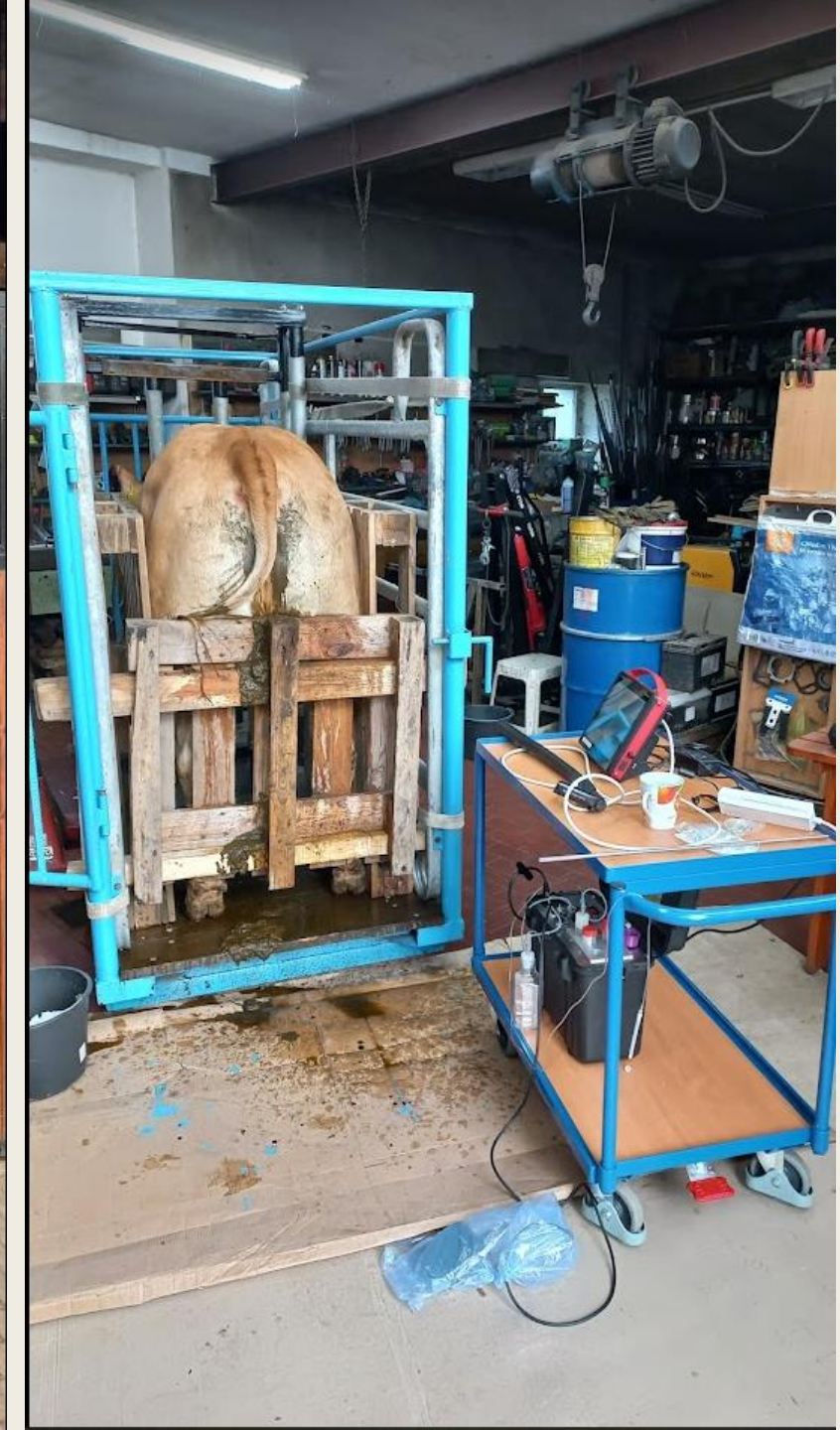


Jsme pořád na cestách...



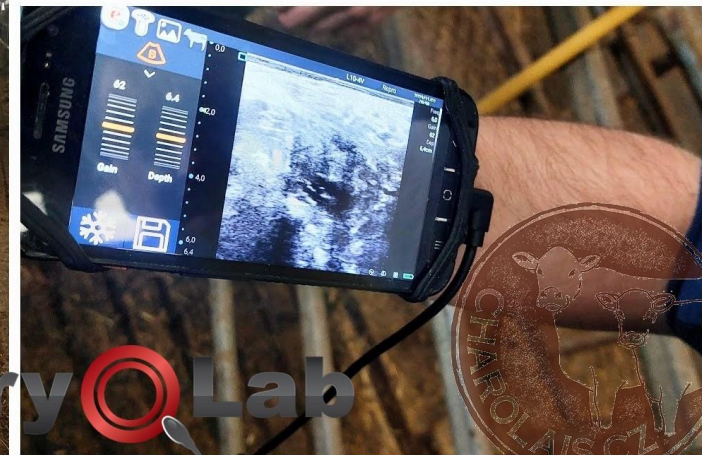
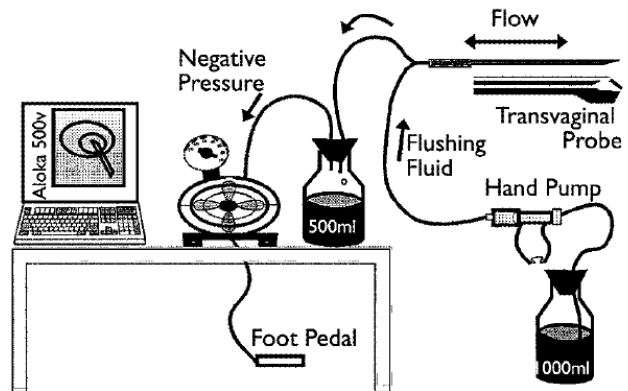
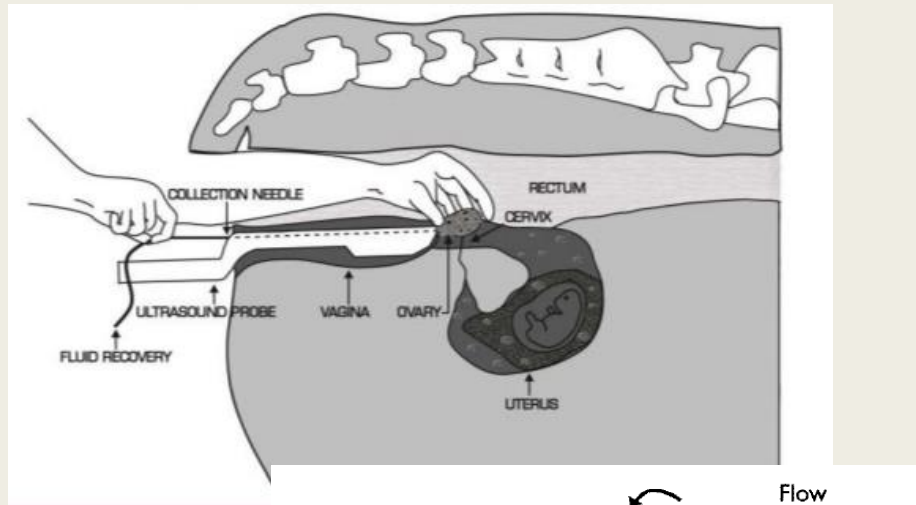
Zázemí pro provádění OPU

- Fixace zvířete
 - *trefujeme se jehlou do několikamilimetrových folikulů*
 - *prakticky neznatelný pohyb dárkyně pohybuje i s vaječníkem*
 - *bez fixační klece to opravdu nejde*
- Oocyty jsou velmi vnímavé na teplotní šok
 - *zásadní je zachování 37 °C po celou dobu manipulace*
 - *teplotní podmínky alespoň >15 °C*
- Čistota „laboratoře“ v terénních podmínkách



Ovum Pick Up

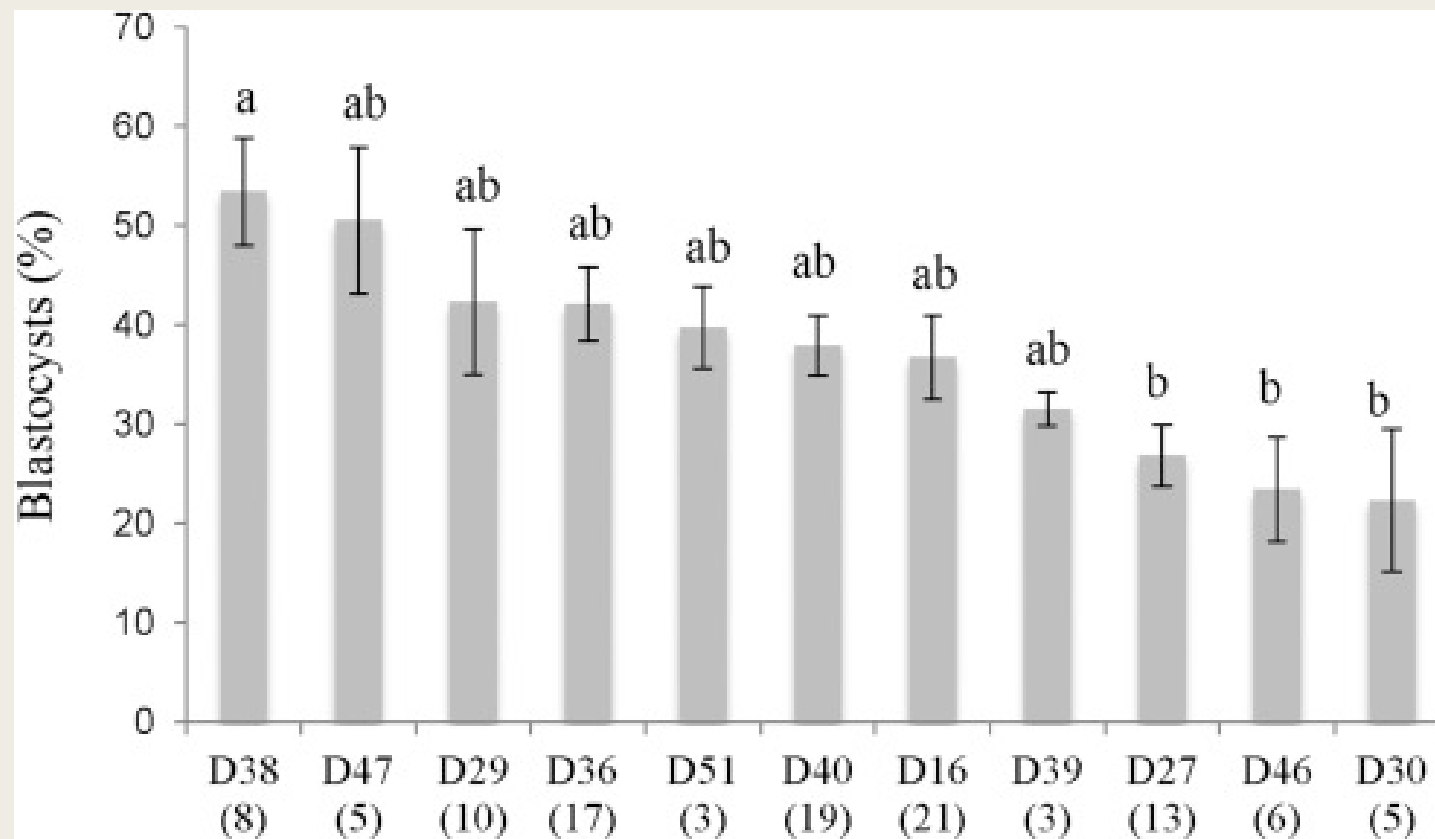
- Ultrazvukový přístroj
- Vakuová pumpa
- Termoblok





Na dárkyni záleží...

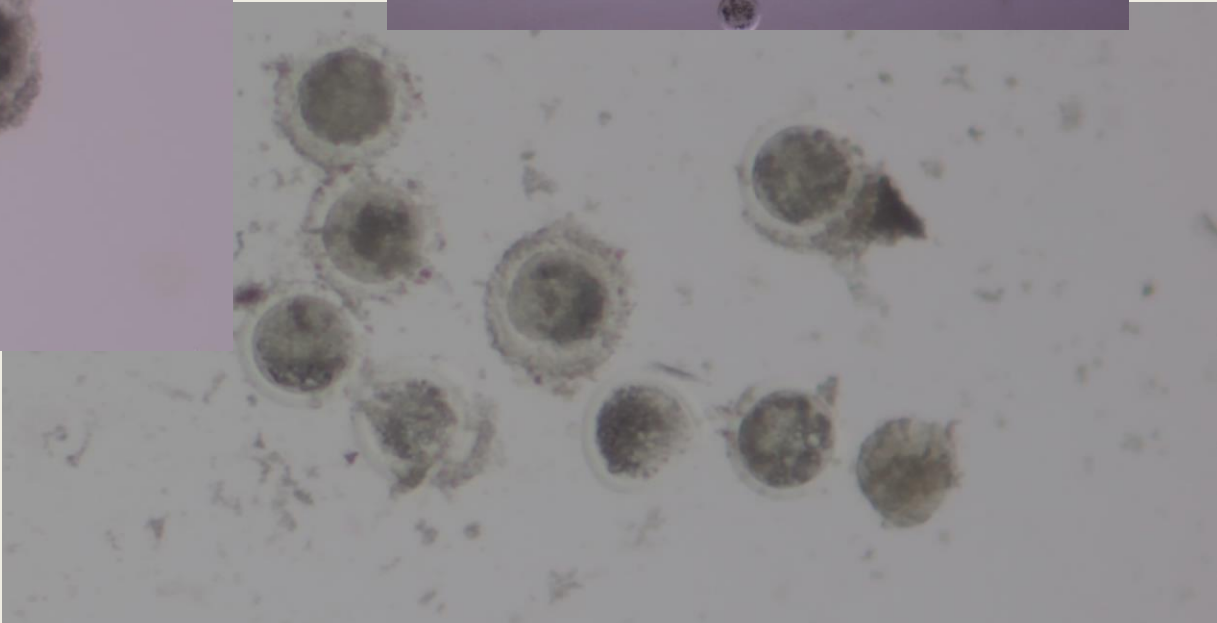
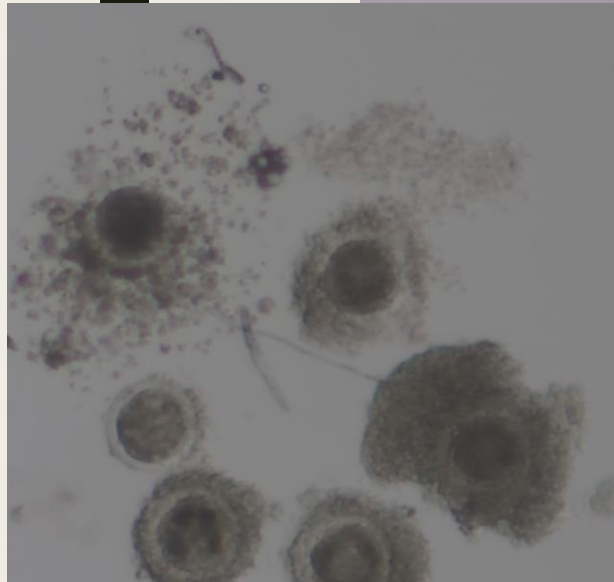
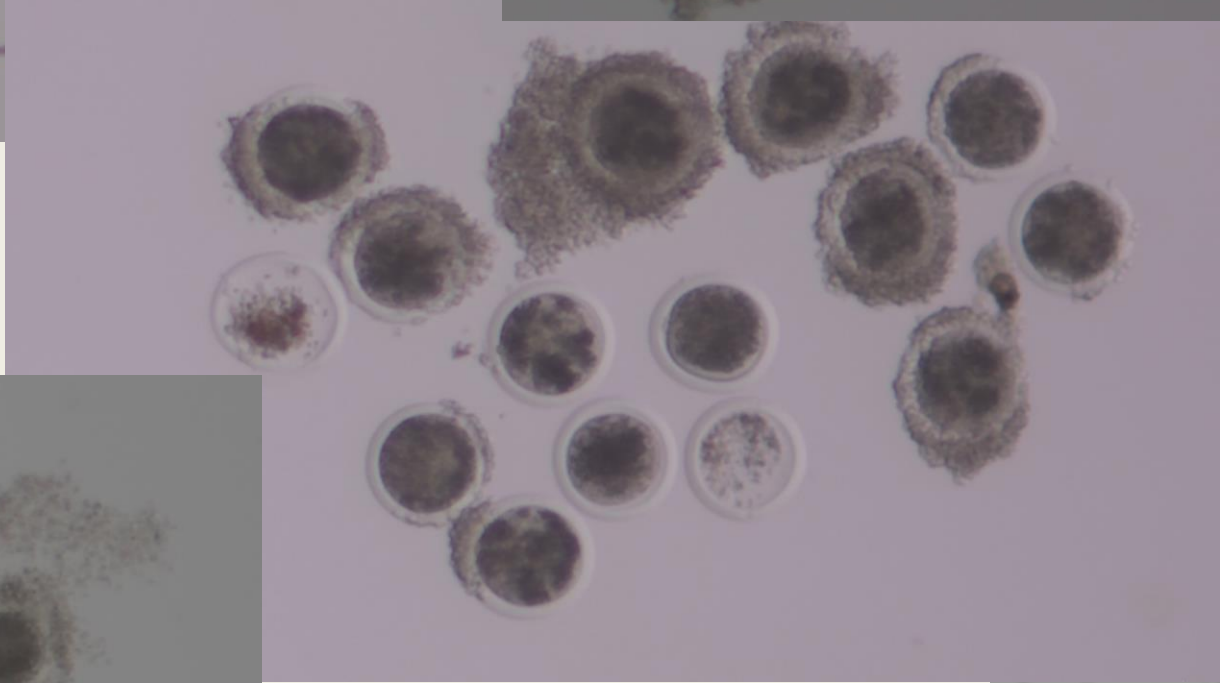
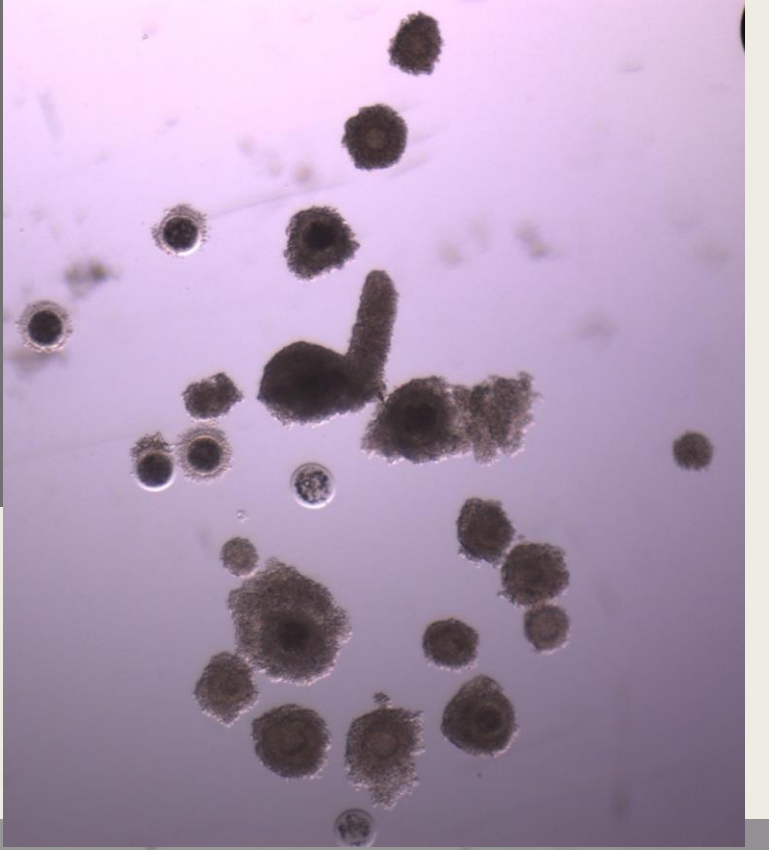
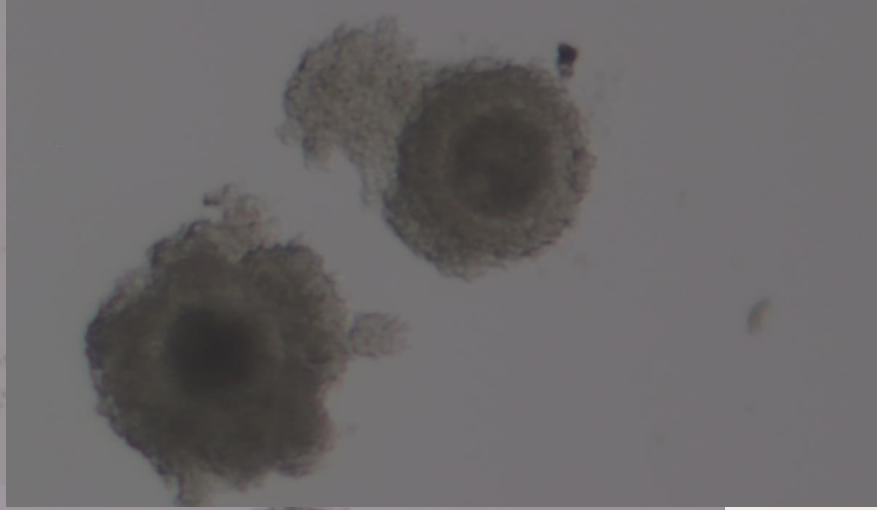
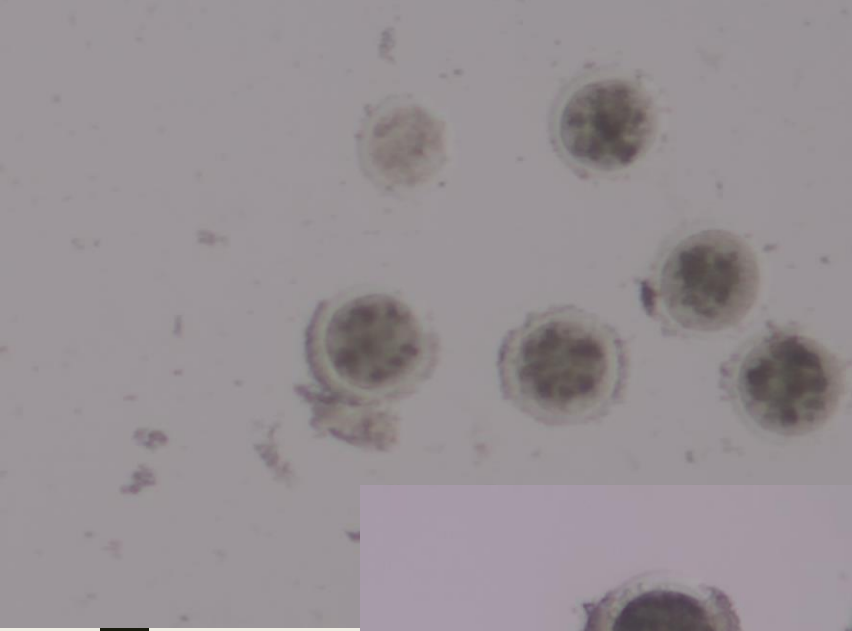
- D38 – D30
 - Číslo krav
- V závorce
 - Počet opakování



Kdy se dají získávat oocyty?

- Jalovice (lepší v pubertě – přirozená hormonální stimulace oocytů)
- Krávy: anestrické, acyklické, cyklující, březí (1. trimestr)
- Obecně 1 x týdně (někdy i 2 x – v rozmezí 3-4 dní)
- 1 x 14 dní (**stimulace s FSH**)
 - *Přesto se dá získat více oocytů z 1 x týdně protokolu (!více návštěv, více fertilizačních a inkubačních cyklů...cena?)*
- Jatečný materiál – jednorázově desítky oocytů





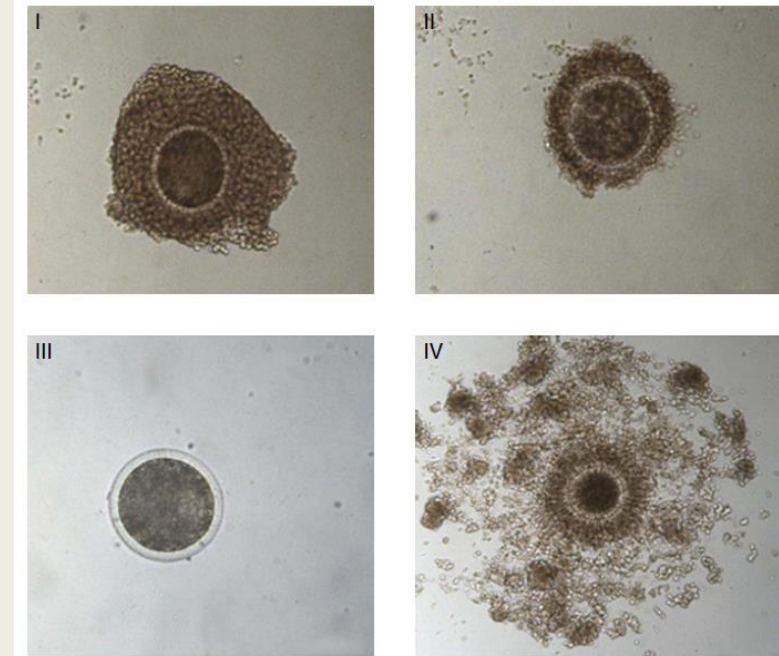


Co se děje s oocyty v laboratoři

- aspirované oocyty neschopné oplození
- nutno maturovat do MII fáze v in vitro podmínkách
- převoz do laboratoře
 - *snaha simulovat in vivo podmínky*

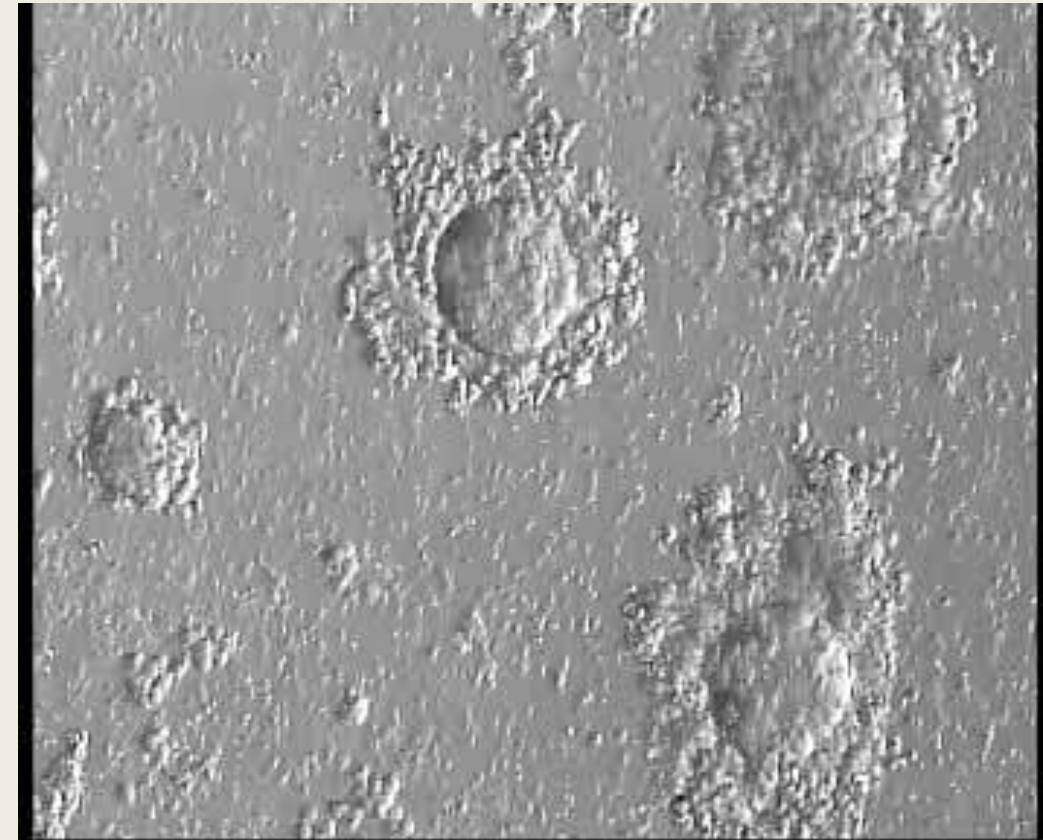
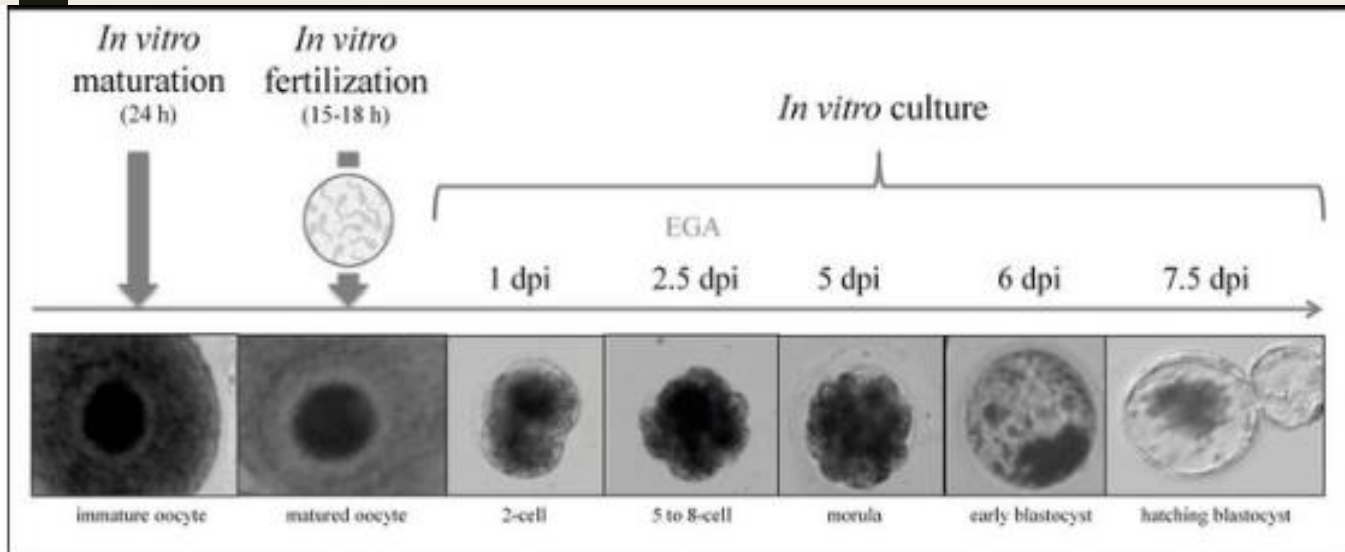
- In vitro zrání oocytů
 - *Ne všechny oocyty jsou vhodné*
 - *Kontroluje se kvalita*

 - *Cca 24 hodin při 38 °C v 5% CO₂*



Oplození a kultivace embryí

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



Výtěžnost

- OPU
 - 20-90 %
 - Cca 50 %

- Zrání do M II
 - 60-80 %

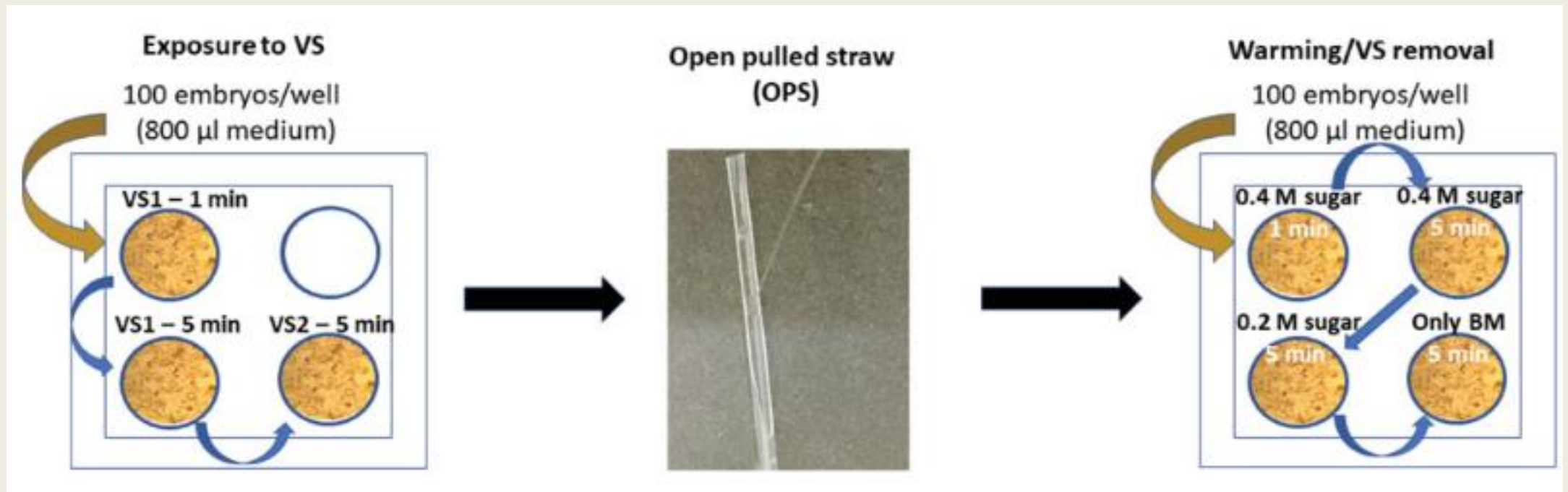
- Vývoj embrya
 - 60-80 %

- Do blastocysty
 - 40-50 %

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

Kryokonzervace = vitrifikace

- Existuje několik možných postupů a metod
- Oproti pomalému mražení vystavení vysokým koncentracím kryoprotektantu
 - *Nutnost promytí po rozmražení (limitující prvek?)*



Kryokonzervace IVP embryí

- 823 embryí, kryokonzervace
- Přenos D7 nebo D8 po říji
- 48% březost

Comparison of the conception rates at 30 and 60 days after transferring fresh, vitrified, or directly transferring the frozen *in vitro*-produced embryos.

Group	Transferred embryos (n)	Pregnancies at Day 30 n (%)	Pregnancies at Day 60 n (%)
Fresh	259	133 (51.35 ± 1.87%) ^a	112 (43.24 ± 1.23%) ^a
Vitrified	234	84 (35.89 ± 3.87%) ^b	73 (31.19 ± 4.01%) ^b
Frozen	311	125 (40.19 ± 4.65%) ^b	108 (34.72 ± 4.15%) ^b

- IVP embrya
 - *není rozdíl*

Pregnancy rates of recipients when assessed at 35, 60 and 90 days of pregnancy.

Treatment	Recipients n	Pregnancy d 35		Pregnancy d 60		Pregnancy d 90	
		n	%	n	%	n	%
Fresh ET	109	45	41.3	41	37.6	41	37.6
Vitrification ET	85	34	40.0	34	40.0	34	40.0

Výhody in vitro produkce embryí

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

Liší se in vitro a in vivo embrya?

- ANO

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

- V zásadě je na vině rozdíl mezi inkubačními podmínkami

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

- Z toho důvodu se věnuje optimalizaci inkubačních podmínek velké úsilí

„Půlení“ embryí

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

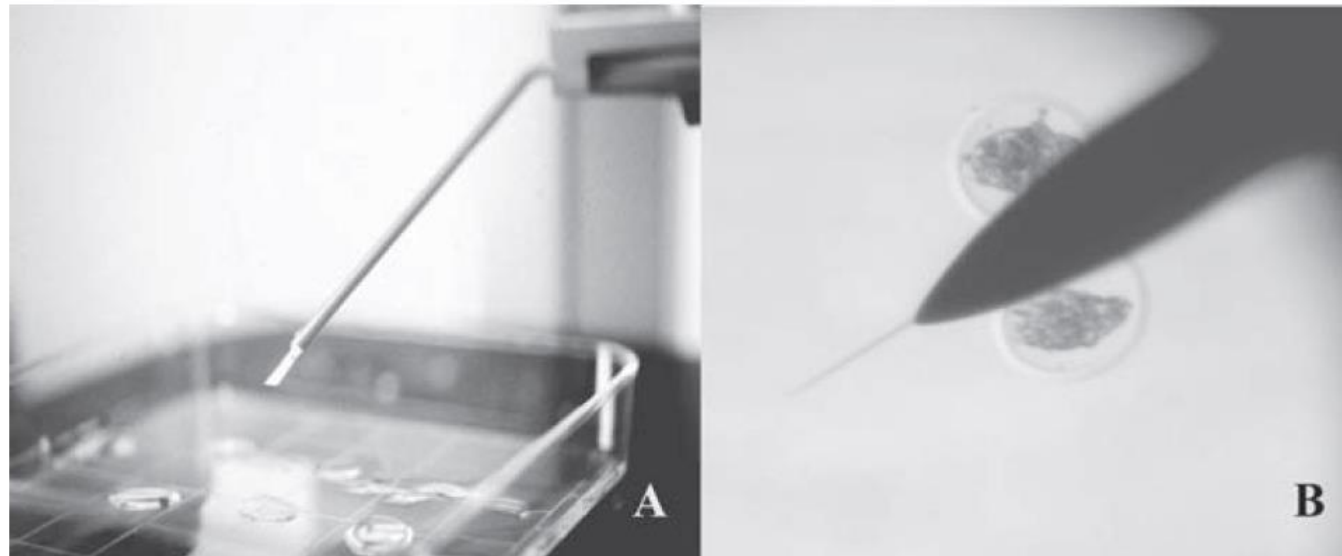
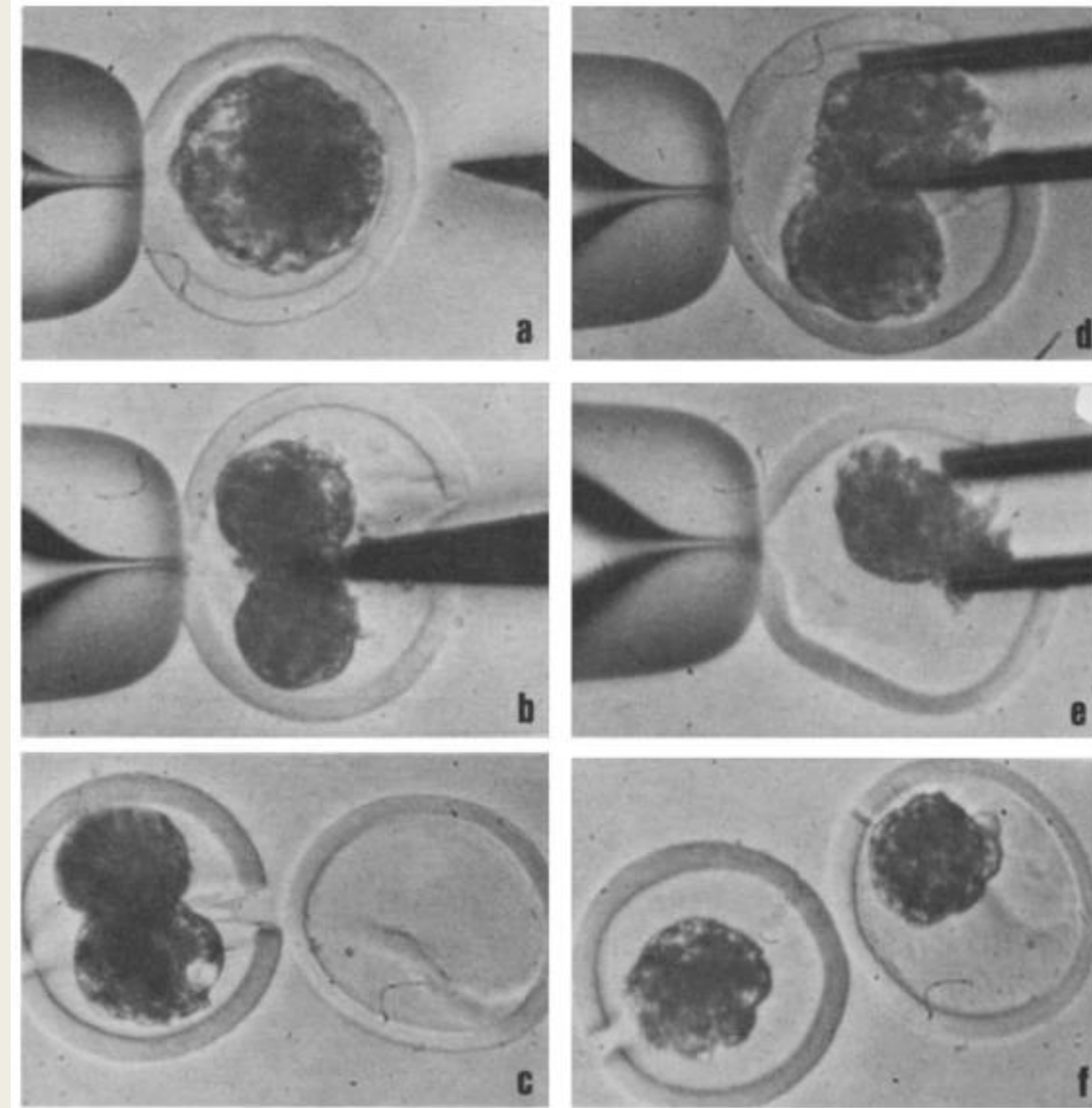


Figure 8.14. (A) Steel microsurgical blade attached to micromanipulator for bisection of embryos held in microdrops of embryo holding medium on the bottom of a Petri dish. (B) Demi embryos after bisection viewed from below with an inverted microscope through the bottom of a Petri dish. Note scratch from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

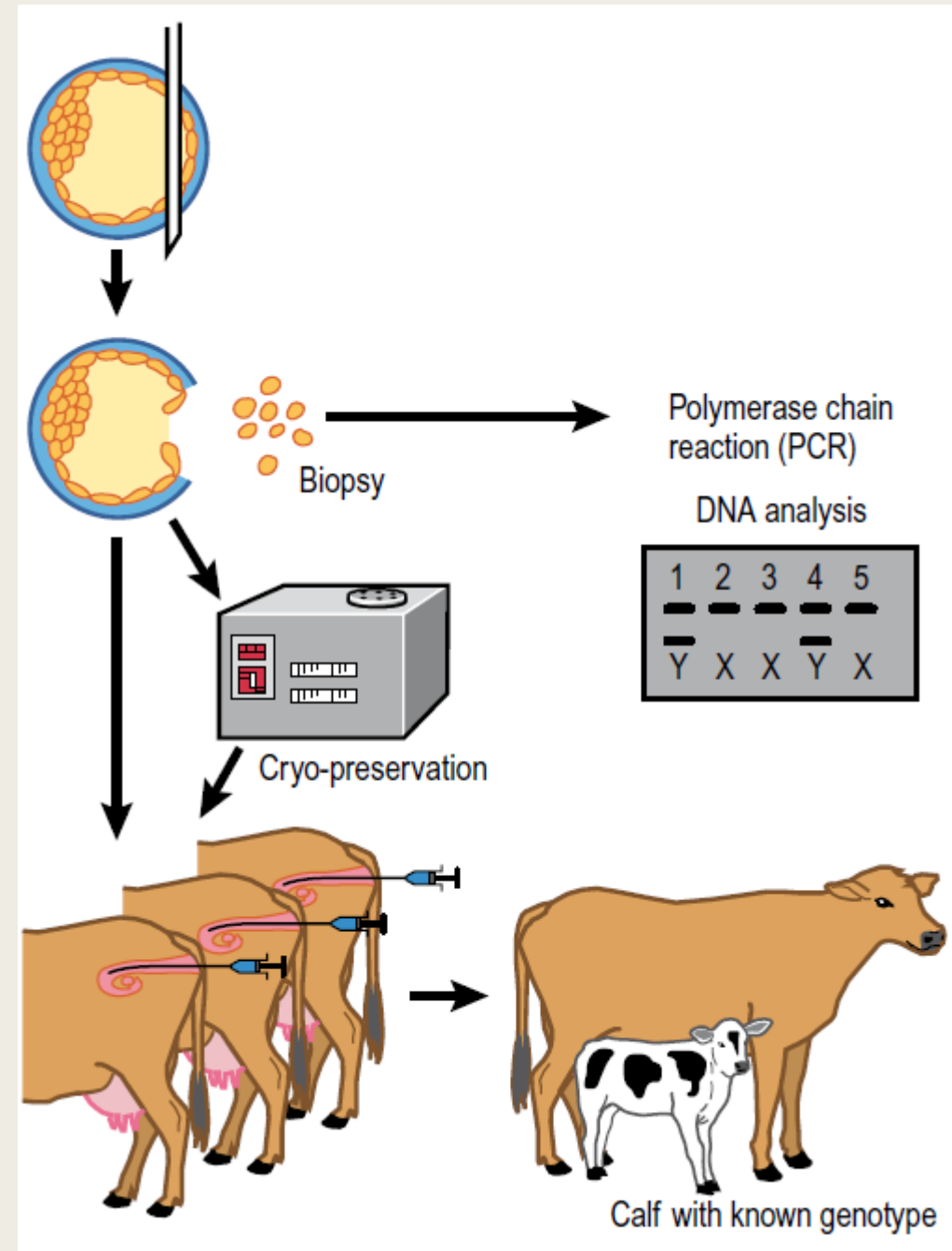


Určování pohlaví embryí

- V počátcích slibná a vítaná technologie
- Embryotransfer na komerční úrovni zvládnutý
- Problém ale v terénních podmínkách

- V dnešní době spíše použití sexovaného ejakulátu

- Sexace embryí se nabízela i v ČR!





Lower quality bovine embryos may be successfully used for sex determination

M. LOPATAROVA¹, S. CECH¹, P. KRONTORAD², L. HOLY¹, J. HLAVICOVA¹,
R. DOLEZEL¹

¹University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences, Brno, Czech Republic

²BOVET Company, Sloupnice, Czech Republic

Table 1. Sex determination in high and lower quality D7-D8 bovine embryos

Embryo quality	Biopsied embryos (<i>n</i>)	Completed sex determination		Questionable determination		Unsuccessful determination	
		<i>n</i>	%	<i>n</i>	%	<i>n</i>	%
High	310	275	88.7 ^a	8	2.6 ^c	27	8.7 ^e
Lower	170	111	65.3 ^b	35	20.6 ^d	24	14.1 ^f

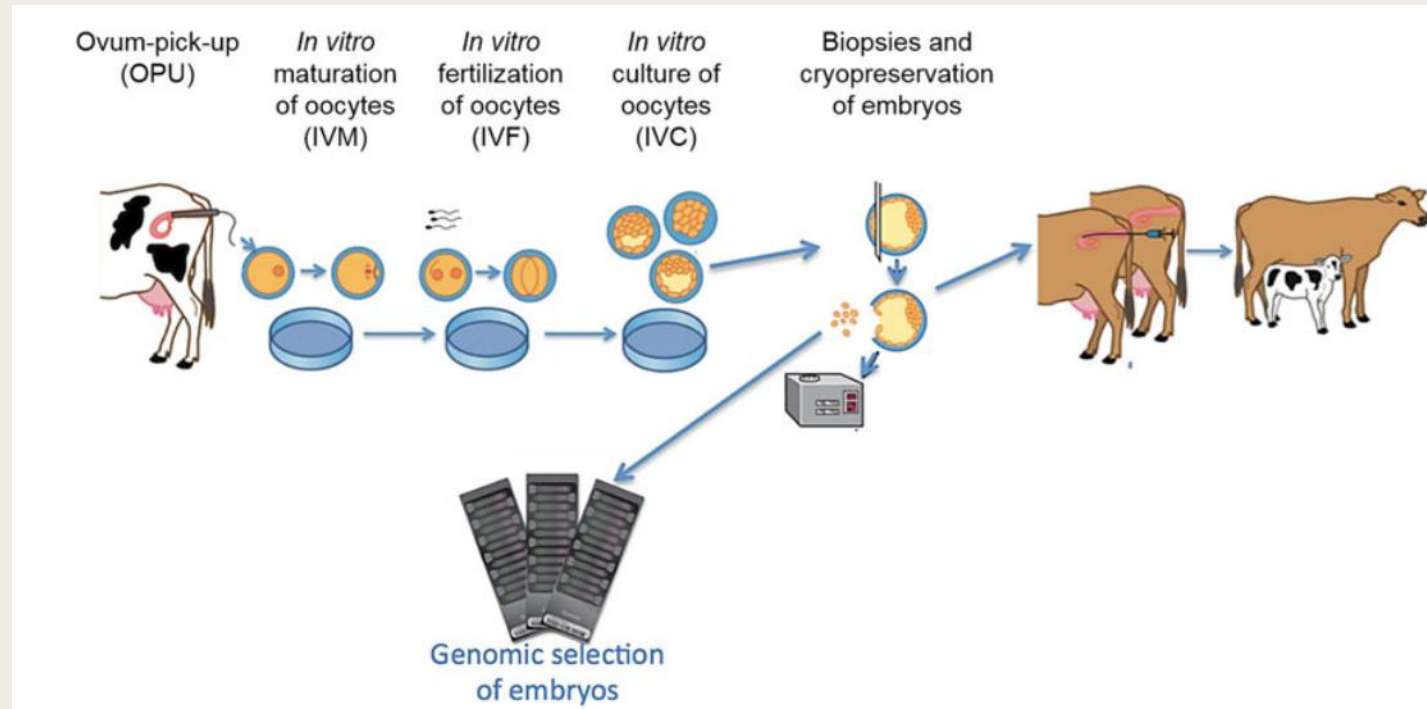
Table 2. Pregnancy rates achieved after the ET of high and lower quality sexed D7-D8 bovine embryos

Embryo quality	Transferred embryos (<i>n</i>)	Pregnant animals	
		<i>n</i>	%
High	122	69	56.6 ^a
Lower	52	27	51.9 ^b

Table 3. Sexing accuracy rates after the calving of recipients to which were transferred high and lower quality sexed D7-D8 bovine embryos

Embryo quality	Estimated as female (<i>n</i>)	Female calves born (<i>n</i>)	Male calves born (<i>n</i>)	Sexing accuracy rate (%)
High	66	63	3	95.5 ^a
Lower	26	25	1	96.2 ^b

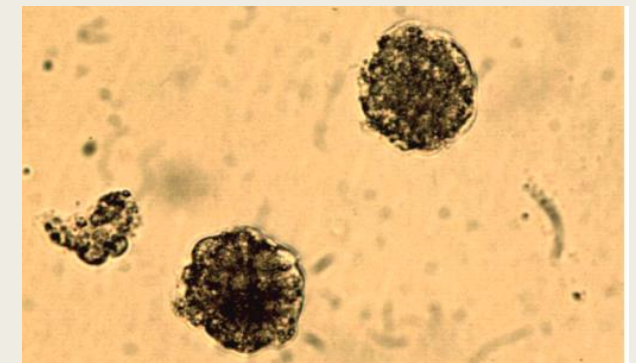
Genotypizace IVP embryí...budoucnost!



- 30-60% březost
– *DT po kryo*



- Biopsie mikronožem – nejčastěji používaná v praxi
- Biopsie aspirací
- Aspirace jehlou



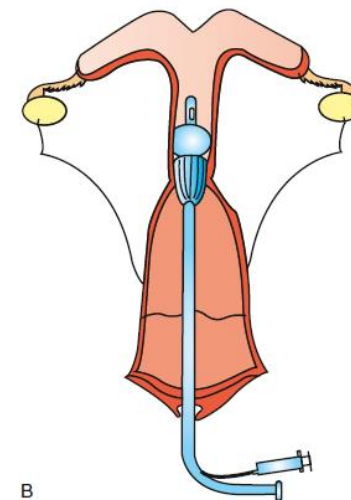
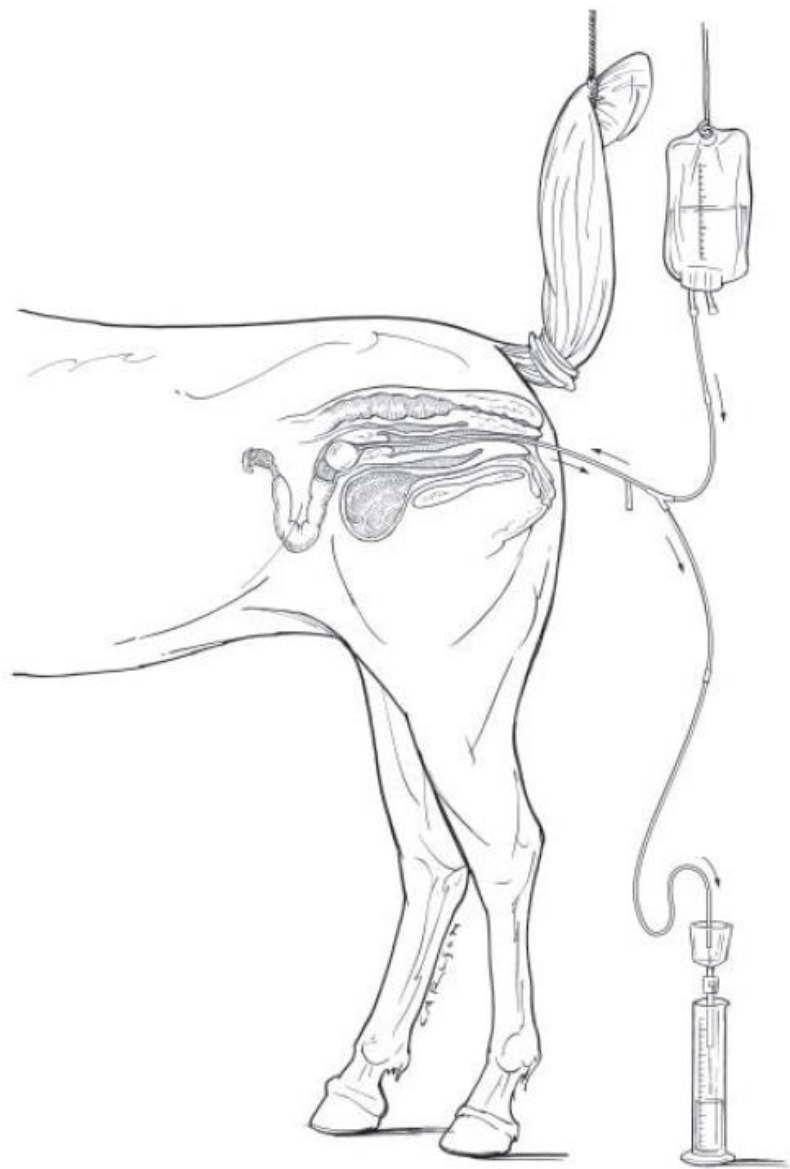
Embryotechnology u koní

Table 2. Total production (transferrable embryos) of IVD and IVP embryos¹ in 2022 in cattle, sheep, goats, and horses, by region

Region	Cattle		Horses		Sheep		Goats	
	IVD	IVP	IVD	IVP	IVD	IVP	IVD	IVP
Africa	2,027	7,377	0	0	0	0	0	0
Asia	1,764	14,733	0	0	0	0	0	0
Europe	137,036	43,749	109	7,153	1,332	6	46	0
North America	204,682	842,064	988	2,979	11,924	176	14,871	2,147
Oceania	12,455	20,633	0	0	22,255	486	2,051	0
South America	36,545	688,415	23,151	4,110	6,959	36	199	0
Total 2022	394,509	1,616,971	24,248	14,242	42,470	704	17,167	2,147
Total 2021	386,374	1,521,018	25,475	11,619	41,183	626	11,193	6,355
% Change	+2.1	+6.3	-4.8	+22.6	+3.1	+12.5	+53.4	-66.2

¹IVD: *in vivo* derived; IVP: *in vitro* produced.

Klasický ET



Co hledáme?

- Hodnocení dle IETS
- Morula nebo blastocysta

- O dalším osudu embrya rozhoduje stádium vývoje a tím pádem i velikost

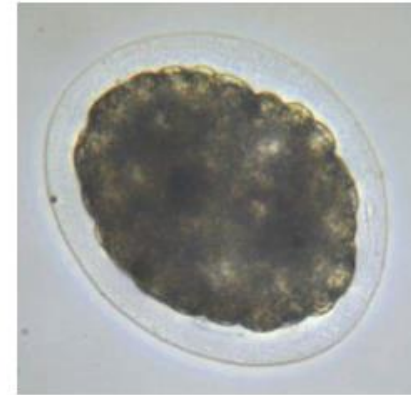
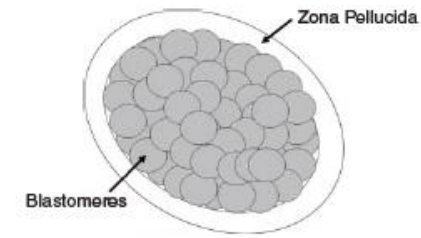


Figure 52.1 Morula stage embryo (grade 1). Note the thick zona pellucida and large blastomeres.

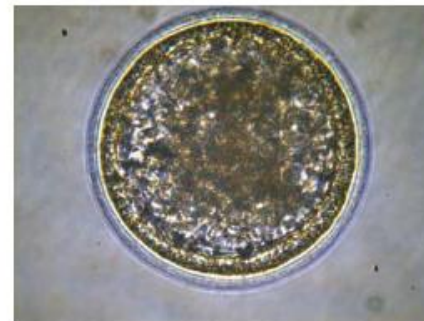
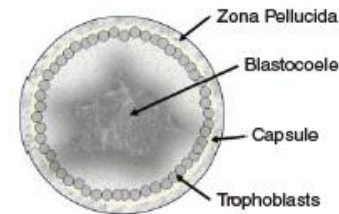


Figure 52.2 Early blastocyst stage embryo (grade 1). Note the thinner zona pellucida, capsule, and small blastocoele cavity.

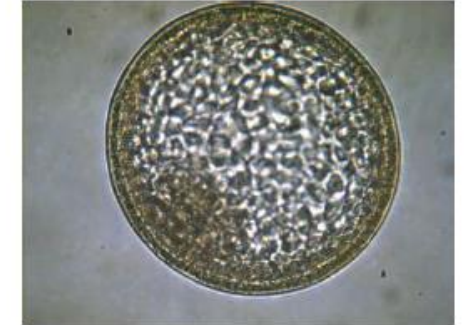
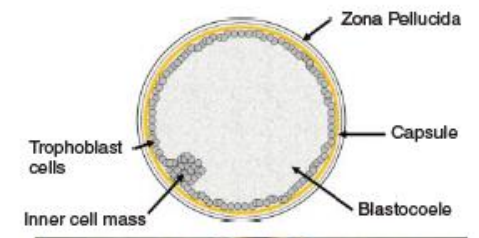


Figure 52.3 Blastocyst stage embryo (grade 1). Note the thin zona pellucida, blastocoele cavity, and distinct inner cell mass.

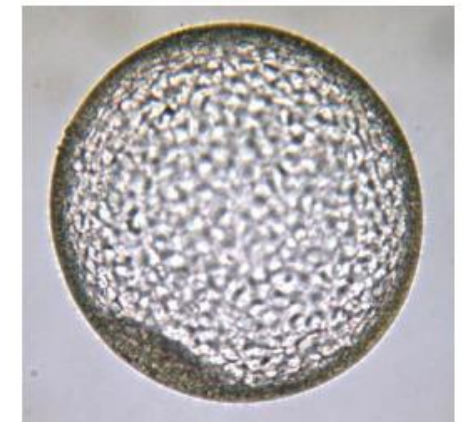


Figure 52.4 Expanded blastocyst stage embryo (grade 1). The zona pellucida has been shed and the capsule is tightly surrounding the embryo.

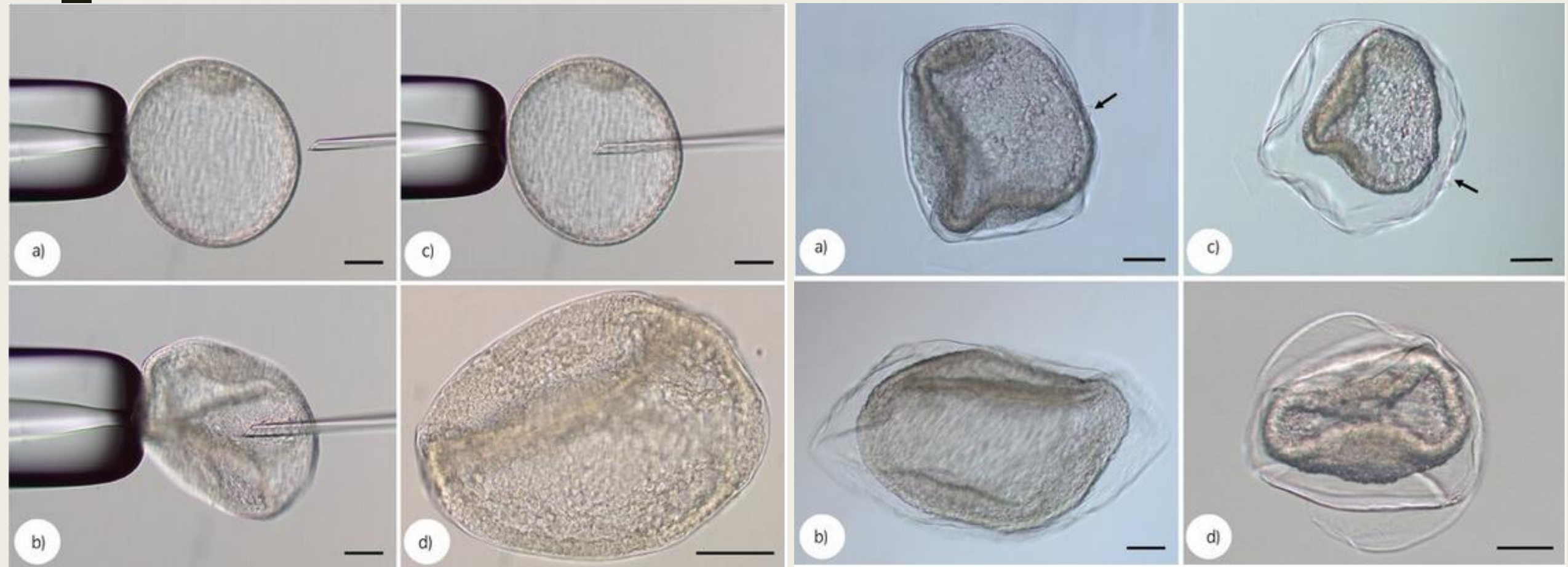
Proporcionální změny embrya

dny po ovulaci	počet E	průměr (mm)	rozpětí (mm)
6	121	0,208	0,132-0,756
7	144	0,406	0,136- 1,460
8	142	1,132	0,120- 3,980
9	41	2,220	0,730- 4,520

průměrná velikost se
zdvojnásobuje každý den!!!!

Vitrification of equine expanded blastocysts following puncture with or without aspiration of the blastocoele fluid

S. WILSHER* , F. RIGALI, G. COUTO, S. CAMARGO and W. R. ALLEN 

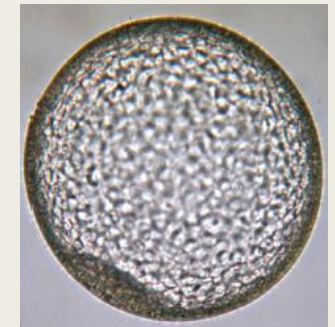
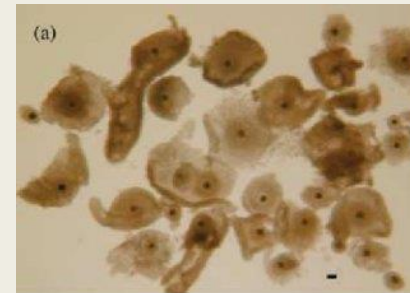


IVPE – in vitro produkce embryí

- časově, finančně a technicky náročná procedura
 - zahrnuje několik na sebe navazujících kroků

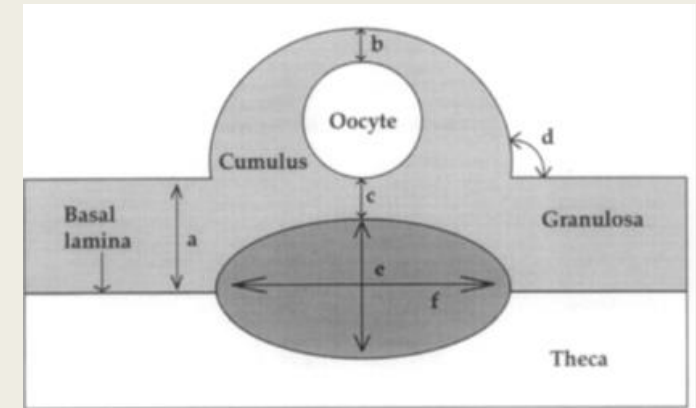


- výběr dárkyně
- sedace a fixace
- sběr oocytů
- in vitro zrání
- in vitro fertilizace
- in vitro kultivace embryí
- přenos nebo kryokonzervace

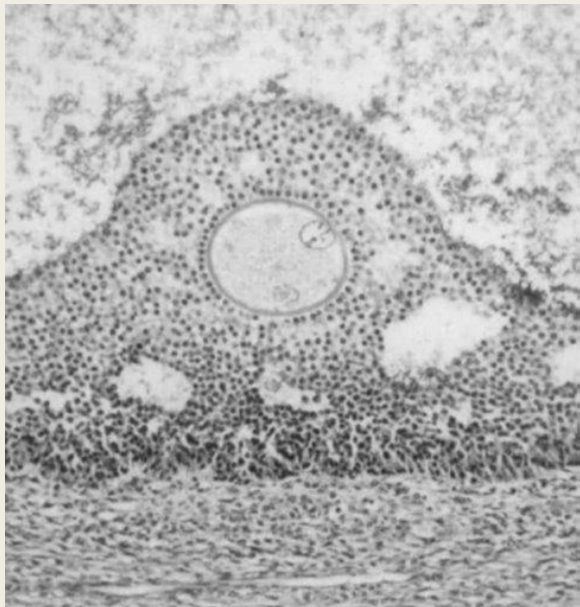


Klisny: aspirace = proplach

- oocyt pevně přichycen ke stěně folikulu
- proplach a seškrábnutí nezbytné (6 – 10x)
- odlišná aparatura než u Bo
- bez proplachu o 50-70% méně oocytů

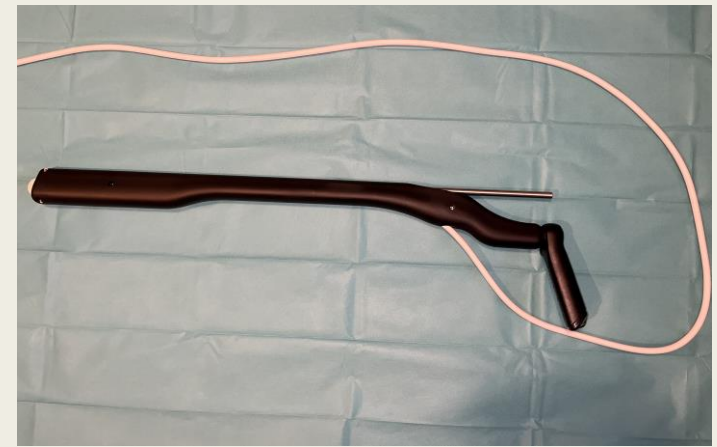


Bo



Eq







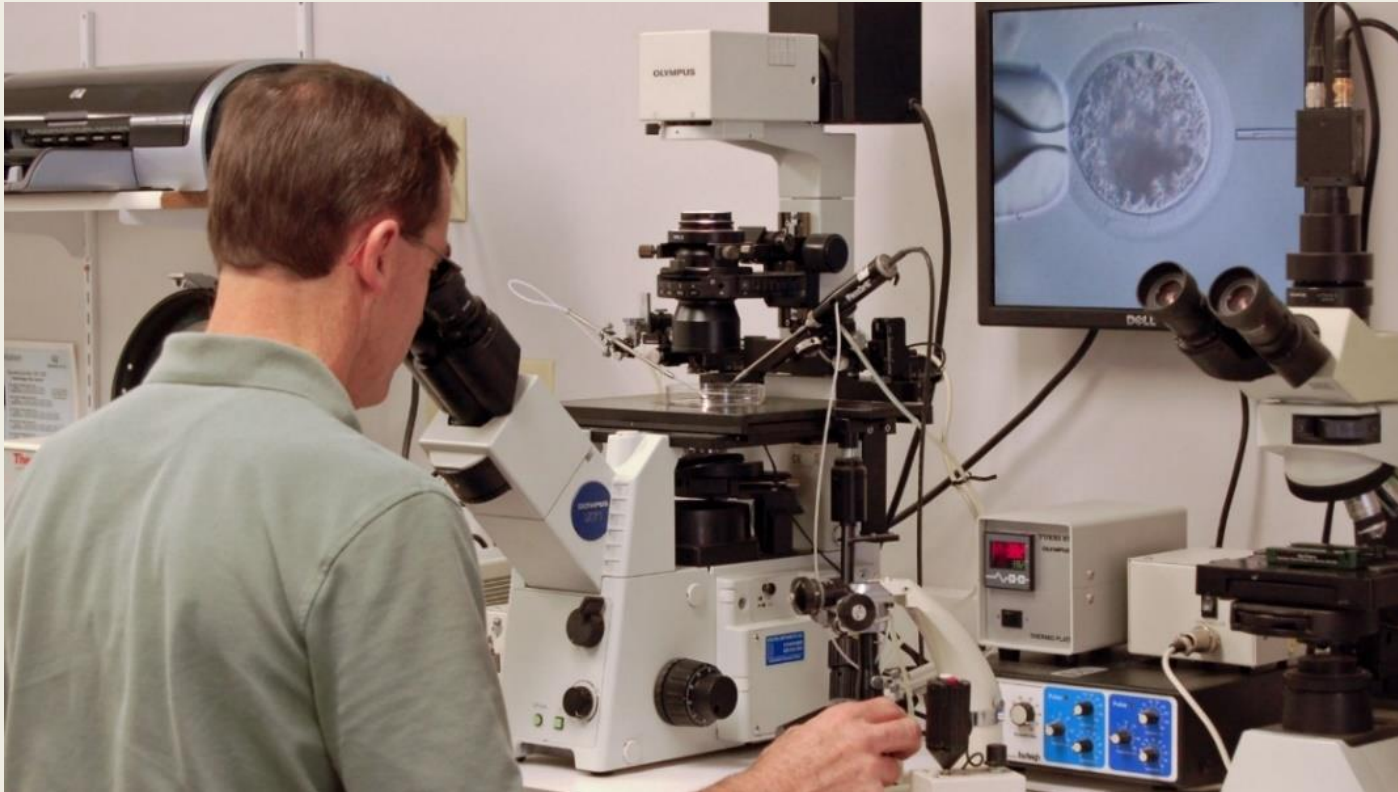
B F 6.6 MHz G 82%
D 7 cm
PRC 9-3-H PRS A
PST 4

BIOPSIE EC123



IVF – in vitro fertilizace

- Komerčně se využívá POUZE metoda ICSI



Milník pokořen...

- Standardní IVF
- U koní se nedařilo (proto ICSI)
- Koncem roku 2022 se v USA zablýskalo na lepší časy...
- 90 % fertilization rate
- 74 % oplozených oocytů = blastocysta
- 3 ET = 3 narozená hříbata
- Evropa rok poté...

Europe's first IVF foal born at Ghent University

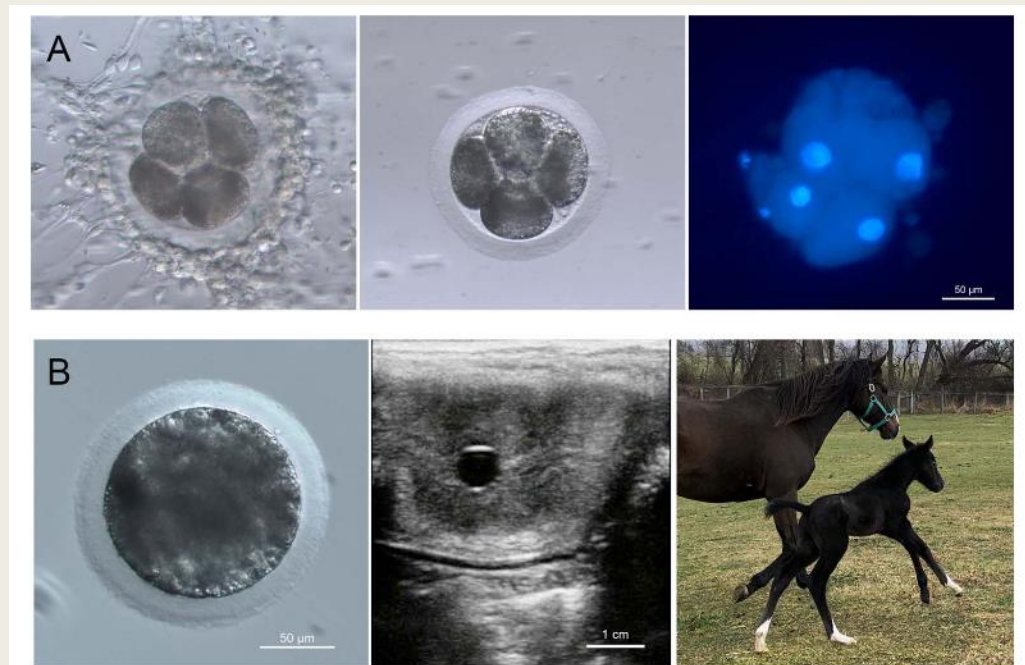
12 September 2023

Biology of Reproduction, 2022, **107**(6), 1551–1564
<https://doi.org/10.1093/biolre/ioac172>
Advance access publication date 15 September 2022
Research Article

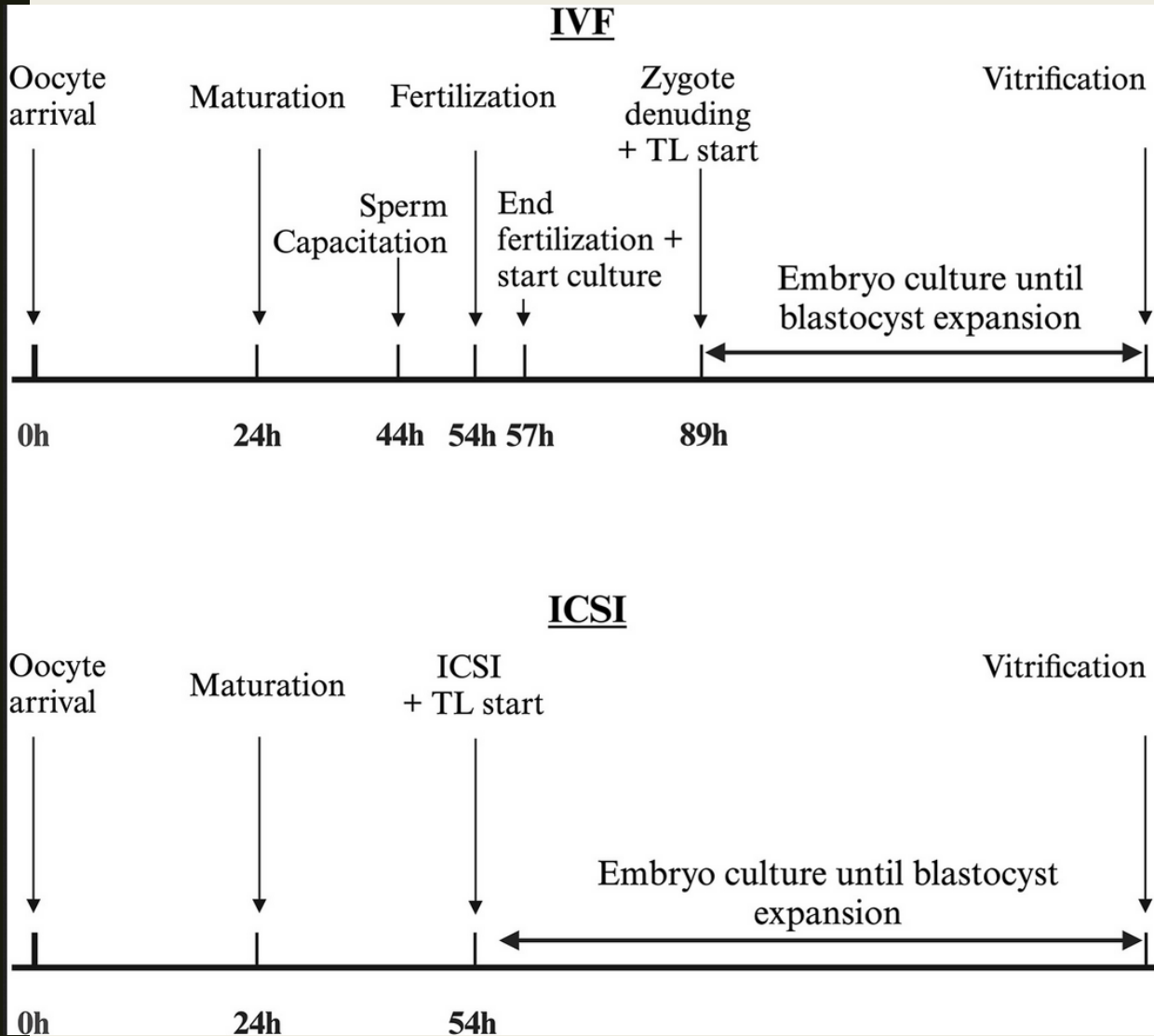
OXFORD

Successful in vitro fertilization in the horse: production of blastocysts and birth of foals after prolonged sperm incubation for capacitation[†]

Matheus R. Felix^{1,2}, Regina M. Turner¹, Tamara Dobbie¹ and Katrin Hinrichs^{1,2,*}



A jedeme dáí!!



IVF with Frozen-Thawed Sperm after Prolonged Capacitation Yields Comparable Results to ICSI in Horses: A Morphokinetics Study

Soledad Martin-Pelaez ^a, Alejandro de la Fuente ^a, Kazuki Takahashi ^a, Itzel Tirado Perez ^a, Jazmin Orozco ^a, Carolina T.C. Okada ^b, Carlos Ramires Neto ^c, Stuart Meyers ^b, Pouya Dini ^a

JSME TÝM!

Embryo  Lab

FarmVet.cz



Ing. Ondřej Šimoník, Ph.D.



MVDr. Tomáš Haloun, Ph.D.



Ing. Anna Boušová



MVDr. Jana Drašnarová

Děkuji za pozornost!