

# Metoda *in vitro* fertilizace *post mortem*: efektivní způsob produkce embryí od neplodných zvířat

Michal Jeřeta,  
Výzkumný ústav veterinárního  
lékařství, v.v.i. Brno,  
Oldřich Rozsévač,  
Zemědělské družstvo Chýšť,  
Kamil Malát,  
Český svaz chovatelů masného  
skotu

## Úvod

Významnou součástí metod reprodukčních biotechnologií jsou techniky založené na embryotransferu. Geneticky cenná embrya jsou získávána především po superovulaci, ale významná je také metoda produkce embryí v podmínkách *in vitro* (IVP). Dle výročních statistik Evropské společnosti pro embryotransfer se v roce 2011 se oproti předchozím letům, výrazně zvýšilo množství přenosů IVP embryí skotu v Evropě a tento trend pokračoval i v roce 2012. V Evropě jsou z tohoto hlediska nejvýznamnějšími zeměmi Německo, Nizozemí, Itálie a Irsko. V těchto čtyřech zemích dohromady bylo v roce 2011 zrealizováno více než 80 % všech přenosů IVP embryí v Evropě. V České republice se produkce IVP embryí počítá řádově na jednotky maximálně desítky kusů ročně. S nástupem metod genomické selekce však mohou metody IVP získat nové uplatnění. Je nutno dodat, že okolní země většinou nejsou schopny vlastní *in vitro* embrya pro chovatele připravit. To je případ Polska, Slovenska, Maďarska a dalších zemí bývalého východního bloku.

Metoda fertilizace oocytů v *in vitro* systému umožňuje produkovat embrya od geneticky cenných rodičů, z oocytů získaných v průběhu života matek technikou transvaginální aspirace (OPU) nebo oocytů získaných *post mortem*, po porážení vyřazených krav z chovu z důvodu neplodnosti



□ Plemence CZ 113351-953 měla výborný exteriér (87 bodů) a v dospělosti dosáhla hmotnosti 1045 kg (foto: Kamil Malát)

nebo jiných poruch zdraví. Tato metoda nabízí možnost připravit embrya nejen od elitních rodičů hospodářsky významných plemen, ale i od jedinců vzácných plemen skotu. Tento článek popisuje případ úspěšné aplikace metody IVP *post mortem* pro získání embryí od neplodné plemence plemene Belgické modrobílé.

## Vynikající neplodná donorka

Plemence CZ 113351-953 byla narozená 11. 1. 2005 v ZD Chýšť po embryotransferu jako dcera po známém belgickém plemníkovi Coliath de Ste Helene (ZBM-205). Tato plemence v chovu dosahovala velice dobrých přírůstků a v dospělosti dosáhla hmotnosti úctyhodných 1045 kg, v kříži jí byla naměřena výška 142 cm a za zevnějšek při lineárním hodnocení získala celkem 87 bodů. Všechny tyto hodnoty řadí tuto plemenci mezi absolutní špičku plemene, a to i v porovnání se zvířaty ze země původu. Její matka CZ 2593-953 byla odchována z dovezeného embrya. Za jejího působení

v chovu byla úspěšně superovulována a vyplachována (celkem 5x) a poskytla 14 embryí. V chovu pak zůstaly 2 její dcery, plemence CZ 113351-953 a její přímá sestra z embryotransferu, která během života poskytla 6 přenosuschopných embryí. Již jako jalovice obě tato zvířata, dosahovala velmi dobrých růstových parametrů.

Plemence CZ 113351-953 byla během života 4x superovulována. Přestože byly pozorovány dobré příznaky říje a inseminace proběhla bez komplikací, nikdy se nepodařilo úspěšně vypláchnout embrya. Ve skupině jalovic a krav plemene belgické modrobílé vystupovala jako bezproblémový jedinec. Neměla problém s ovariálními cystami a její pohlavní cyklus probíhal výrazně a pravidelně. Bohužel tato plemence nezabřezla ani při klasické říji a inseminaci. Anomálie na děložním krčku, která byla zřejmá již při první inseminaci, byla pravděpodobně jednou z příčin neúspěšného výplachu. Jelikož plemence nezabřezávala, bylo u ní pode-

zření na neprůchodnost vejcovodů. To se stalo rozhodujícím důvodem porážky v roce 2013. Při porážce byly odebrány vaječníky a transportovány do Laboratoře reprodukčních biotechnologií Výzkumného ústavu veterinárního lékařství v Brně.

### Metoda *in vitro* produkce embryí *post mortem*

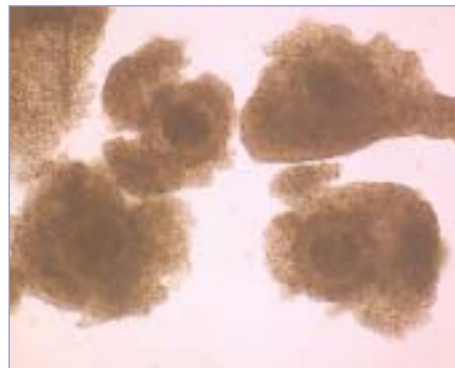
Výše popsané problémy při standardní inseminaci i superovulaci zabránili úspěšné reprodukci tohoto vynikajícího zvířete. Z těchto důvodů byla zvolena metoda IVP *post mortem* využívající izolace oocytů z ovárií poraženého zvířete. Při této technice je významné otestovat vhodnost vybraných býků pro systém IVP.

#### 1) Test vhodnosti vybraných býků pro systém IVP

V minulosti byly základním kritériem pro zařazení býka do IVP programu jeho výsledky v inseminaci. Jako spolehlivější metoda se však ukázala testace býků pomocí oocytů jatečných krav, kdy fertilizační schopnost spermií je ověřována rychlostí penetrace a efektivitou monos-

permického oplození. Z hlediska predikce fertility bylo zjištěno, že u býků úspěšných v *in vitro* systému byla kapacitace spermií a penetrace do oocytů výrazně rychlejší než u býků průměrných.

Pro tento test byly oocyty získávány z ovárií jatečných krav. Pro testaci spermií byly selektovány pouze morfologicky kvalitní oocyty, které se nechaly dozrát v podmínkách *in vitro*. Následně byly dozrálé oocyty fertilizovány vybranými býky. Vzhledem k citlivosti býků k různým koncentracím heparinu byl v tomto případě také testován vliv dvou různých koncentrací heparinu na fertilizační schopnost býků. V tomto testu tedy byli testováni dva býci a dvě různé koncentrace heparinu. Na základě těchto výsledků byl vybrán býk a zároveň pro něj vhodná koncentrace heparinu. Je nutno dodat, spolu byli srovnáváni dva býci a že motilita byla u vybraného býka výrazně nižší (35 %) než u býka, který nebyl vybrán a byl v systému IVF neefektivní (60 %). Po separaci spermií před fertilizací se však rozdíl smazal a při vlastním IVF byl vybraný býk výrazně efektivnější (celková účinnost



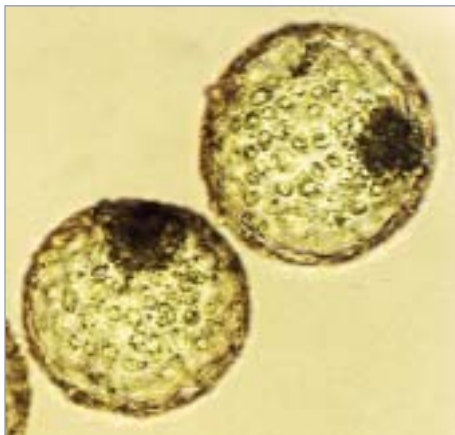
□ Oocyty skotu těsně po izolaci z vaječníků poražených krav. Tyto oocyty zrají v *in vitro* podmínkách 24 hodin a poté jsou fertilizovány spermiemi vybraného býka (foto: Michal Ješeta)

fertilizace byla 80,5 % oproti 25 % u nevybraného býka). Je obecně známo, že vynikající výsledky býků v inseminaci nejsou zárukou dobrých výsledků při *in vitro* fertilizaci. Z těchto důvodů je nezbytné vždy používané býky tímto způsobem otestovat. Tento test ovšem není nutné u konkrétního býka znovu před další fertilizací opakovat.

Pro *in vitro* fertilizaci byl v tomto případě vybrán býk státního registru ZBM-223 Lorenc. Tento plemeník pocházel také z chovu ZD Chýšť na stáji zootechnika pana Oldřicha Rozsévače. Lorenc je bezpochyby doposud nejlepším belgickým plemeníkem z domácí produkce. Své kvality potvrdil nejenom excelentním zevnějškem, za který byl ohodnocen celkem 82 body, ale zejména svými růstovými parametry, kterých se dosud žádnému jinému býkovi z domácí produkce nepodařilo dosáhnout. V jednom roce Lorenc vážil 604 kg a měřil 131 cm, což je o více než 130 kg a 10 cm lepší výsledek nežli průměr všech doposud vybraných býků! Vynikající jsou rovněž jeho plemenné hodnoty zejména pro zevnějšek a růst v přímém efektu. Pierre Mallieu, ředitel belgické plemenné knihy, jej při své návštěvě v ČR označil za býka, který se svými kvalitami směle vyrovná nejlepším inseminačním plemeníkům v Belgii.



□ Pro *in vitro* fertilizaci byl vybrán býk Lorenc (ZBM-223) pocházející z chovu ZD Chýšť (foto: Kamil Malát)



□ Expandované blastocysty skotu 8 dní po fertilizaci vhodné pro yokonzervaci nebo přenos do příjemkyň (foto: Michal Ješeta)

## 2) Produkce embryí *in vitro*

Plemence CZ 113351-953 byla poražena na jatkách 4. den pohlavního cyklu a její ovária byla transportována do laboratoře při 34,5 °C. Okamžitě po příjezdu byla ovária zpracována a byly vyizolovány jednotlivé oocyty vhodné pro *in vitro* zrání. Podařilo se z obou ovárií vyizolovat celkem 20 oocytů, které byly přeneseny do zračního média M199. Oocyty získané touto metodou byly rozděleny do dvou skupin dle morfologických znaků. Pro tyto potřeby byl hodnocen stav cytoplazmy oocytu a morfologie kumulární vrstvy obklopující oocyt. Izolované oocyty zrály po dobu 24 hodin při teplotě 38,5°C v regulované atmosféře obsahující 5 % CO<sub>2</sub>.

Po *in vitro* zrání byly oocyty fertilizovány v IVF médiu. Insemináčnící dávky byly rozmrazeny ve vodní lázni a následně byly izolovány motilní. Pro inseminaci oocytů bylo použito IVF médium obsahující 1x10<sup>6</sup> spermií/ml a 1,8 USP/ml heparinu. Za 12 hodin po inseminaci byly oocyty přeneseny do kultivačního

vačního média s monolayerem BRL buněk. V tomto prostředí byla embrya dále kultivována po dobu 7 dní.


Po 7 dnech byla sebrána embrya vhodná pro kryokonzervaci. Po kultivaci bylo celkem získáno 10 blastocyst. Úspěšnost embryonálního vývoje byla paradoxně vyšší u oocytů s dobrou morfologickou kvalitou než u oocytů klasifikovaných jako vynikající. Tento stav se u některých zvířat vyskytuje a jen potvrzuje subjektivitu morfologické klasifikace. Odebraná embrya byla zamrazena standardním způsobem (pomocí zmrazovače Planner Kryo) a následně přenesena do tekutého dusíku, kde jsou uchována až do transferu do příjemkyň.

## Závěr

Metoda IVP *post mortem* nabízí efektivní možnost jak využít genetický potenciál samic s reprodukčními problémy, které již pravidelně necyklují. Alternativou k metodě IVP *post mortem* je metoda získání oocytů metodou OPU (ovum pick up). Metoda OPU je transvaginální aspirace oocytů z antrálních folikulů, kdy není nutné hormonálně stimulovat donorku. U zvířat cyklujících lze na jedno OPU získat 8–10 oocytů, po jejichž fertilizaci v prostředí *in vitro* mohou být připravena až 4 embrya (průměr v EU 1,6 embrya/OPU). Pokud je neplodnost způsobena neprůchodností vejcovodů a funkce vaječnicků zůstává zachována, tak lze tímto způsobem získat kvalitní embrya. Během metody OPU/IVF nejsou vejcovody vůbec v kontaktu s oocyt. Nejprve je oocyt aspirován

přímo z folikulu na ováriích a po IVF je embryo přeneseno zpět rovnou do dělohy. Navíc v některých případech aspirace antrálních folikulů z vaječnicků neplodných zvířat nastartuje folikulogenezi a stimuluje ovarialní cyklus.

Metoda přípravy IVP embryí je náročná především z hlediska nezbytné testace všech použitých médií a aditiv. Významné je také otestování každého býka a jeho vhodnosti pro IVP systém. I přes tyto skutečnosti má tato biotechnologická metoda své nesporné výhody.

Je však třeba poznamenat, že telata narozená po IVP mají častěji vyšší porodní hmotnost, což může přinášet komplikace v podobě vyššího výskytu problematických porodů. Při správné spolupráci chovatele s veterinárním lékařem v období porodu lze však těmto problémům velice účinně předcházet. V tomto případě získal chovatel 10 blastocyst od plemence, u které se v minulosti marně snažil o získání telete. Z praktického hlediska je nutno poznamenat, že vlastní náklady na tuto metodu jsou srovnatelné s náklady na superovulaci. Metoda IVP je sice metodicky a organizačně náročnější, ale často může být jedinou cestou jak získat tele od neplodné plemence. Laboratoř reprodukčních biotechnologií při Výzkumném ústavu veterinárního lékařství v Brně poskytuje chovatelům metody *in vitro* produkce embryí skotu již od devadesátých let minulého století. V minulých letech sice zájem o tyto metody poklesl, ale i v současnosti může metoda IVP představovat užitečný nástroj ve šlechtění skotu. 

## Efektivita *in vitro* fertilizace a vývoj embryí 7 dní po inseminaci

| Morfologická kvalita oocytů | Počet izolovaných oocytů | Počet dělicích se embryí po 7 dnech | Počet zmrazitelných blastocyst po 7 dnech |
|-----------------------------|--------------------------|-------------------------------------|---|
| vynikající                  | 8                        | 6 (75 %)                            | 3 (37,5 %)                                |
| dobrá                       | 12                       | 11 (91,7 %)                         | 7 (58,3 %)                                |
| Celkem                      | 20                       | 17 (85 %)                           | 10 (50 %)                                 |

Vzniklo za podpory výzkumného záměru MZE 0002716202

a projektu NAZV QI 91A018

Kontakt: Výzkumný ústav veterinárního lékařství, Hudcova 70, 621 00 Brno, Ing. Michal Ješeta, PhD.

Laboratoř reprodukčních biotechnologií  
Oddělení genetiky a reprodukce  
tel.: 533 331 420, e-mail: jeseta@vri.cz