

A decorative L-shaped frame composed of thick black lines. One vertical line runs down the left side, and one horizontal line runs across the top, meeting at a right angle in the top-left corner. Another vertical line runs down the right side, and another horizontal line runs across the bottom, meeting at a right angle in the bottom-right corner.

EMBRYOTRANSFER V PRAXI

Doc. Ing. Jiří Šichtař, Ph.D.

Ing. David Hruška

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

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

FarmVet.cz

- EmbryoLab s.r.o.
 - *Společnost založena březen 2023*
 - *Sídlo: areál ČMSCH*
 - *In vitro produkce embryí skotu (z živých dárkyň, vaječnicků)*

EmbryoLab



Ing. David Hruška

- Mendelova univerzita v Brně
 - *Agronomická fakulta*
- Bovet a.s.

- Střední škola zemědělská a veterinární Lanškroun
 - *ředitel, výuka Reprodukce zvířat*
 - *vedoucí týmu pro odběr embryí skotu*



**STŘEDNÍ ŠKOLA
ZEMĚDĚLSKÁ A VETERINÁRNÍ
LANŠKROUN**

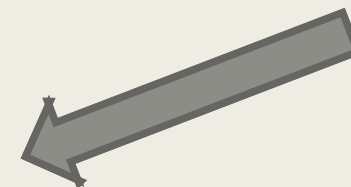
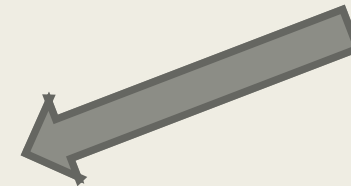
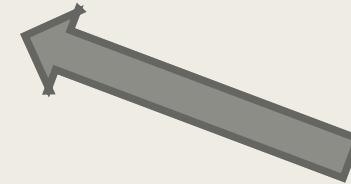
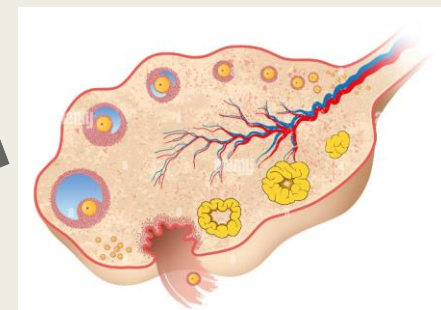
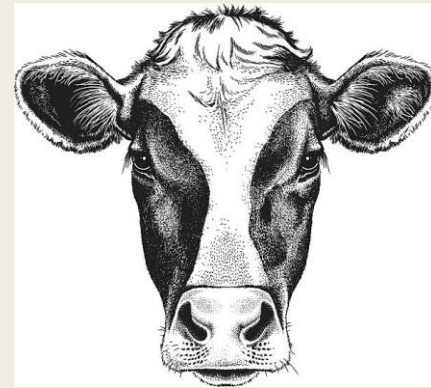
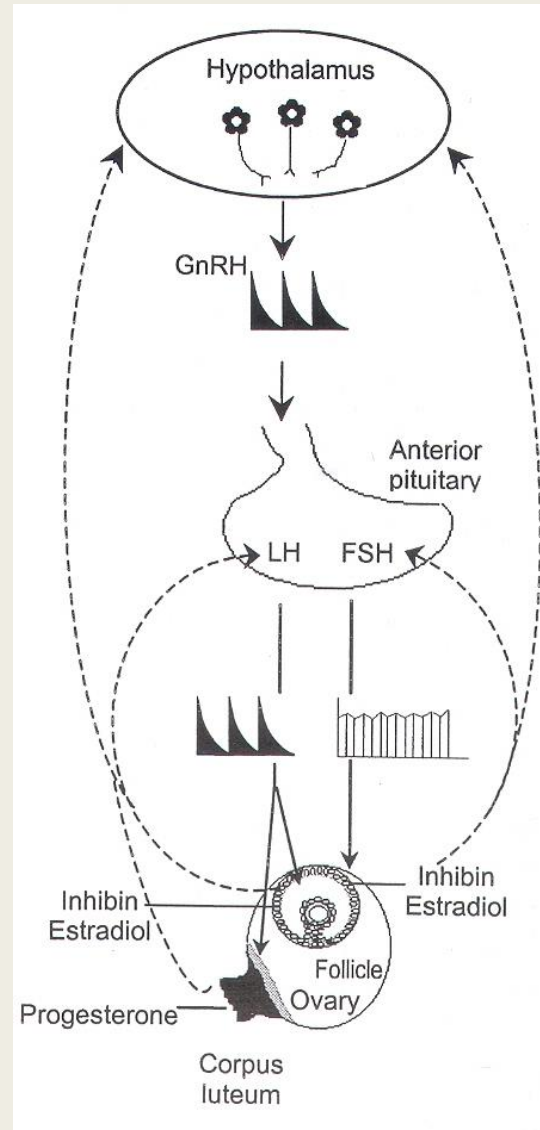
Co je dobré vědět než začneme s ET...

- Fyziologie reprodukce
 - *Proč a jak rostou na vaječnicích folikuly a žluté tělísko?*
 - *Jak dochází k oplození?*
 - *Vývoj časného embrya*

- Poporodní aktivita vaječníků a co ji ovlivňuje
 - *Jaké krávy vybírat s ohledem na aktivitu vaječníků?*
 - *Kdy je vhodné uvažovat o ET?*

Jak je řízena reprodukce?

- Řízení je neurohumorální: nervová a hormonální složka
- Jde o velmi složité mechanismy, které jsou hierarchicky uspořádané
- Mechanismus zpětných vazeb
- Uzavřený kruh
- Autoregulace

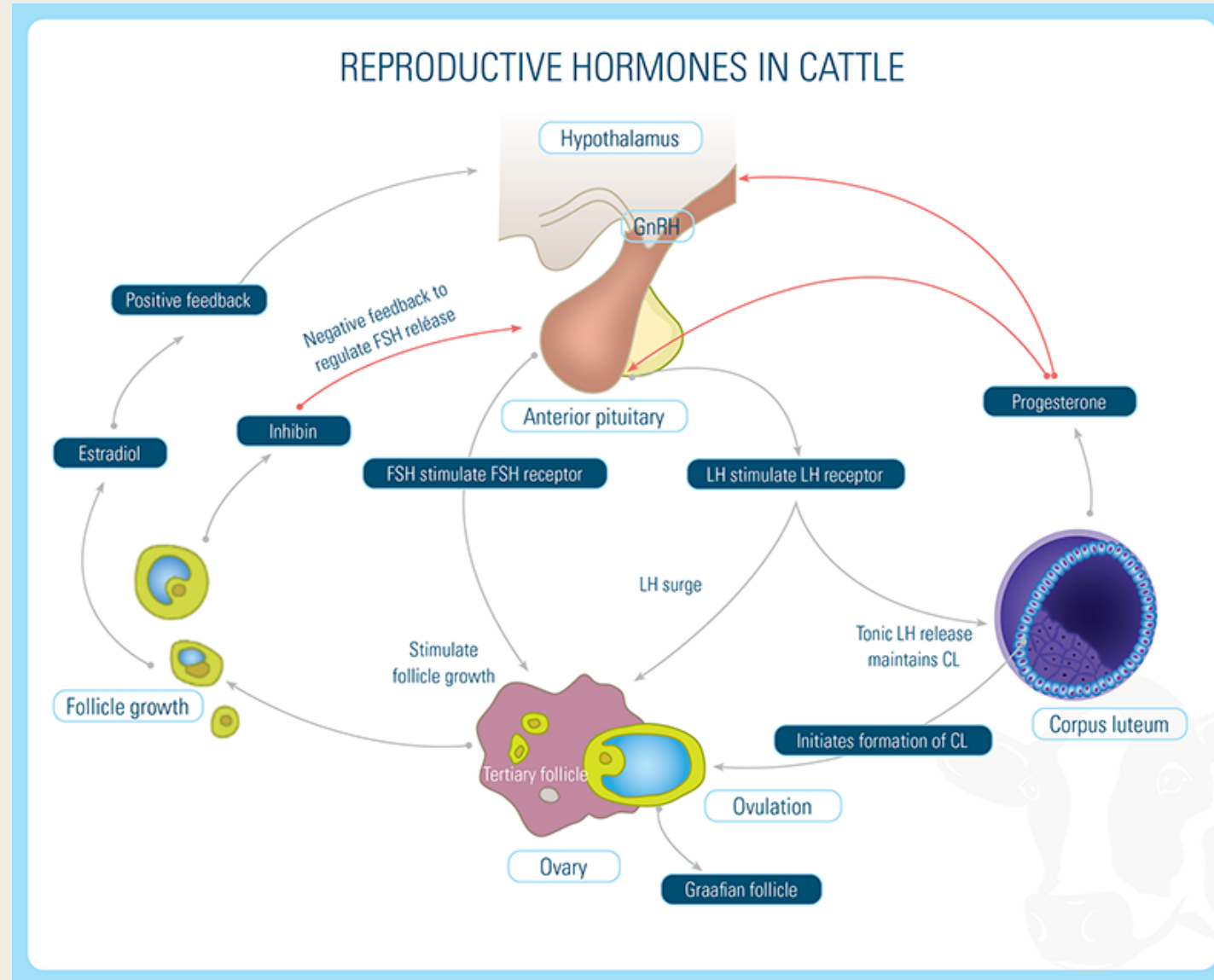


Je to ještě složitější, než to vypadá...

■ Aby vše fungovalo

- Dostatek kvalitního krmiva
- Minimální stres
- Vlídne zacházení
- Zoohyg. podmínky

- Bez chorob (děloha!)



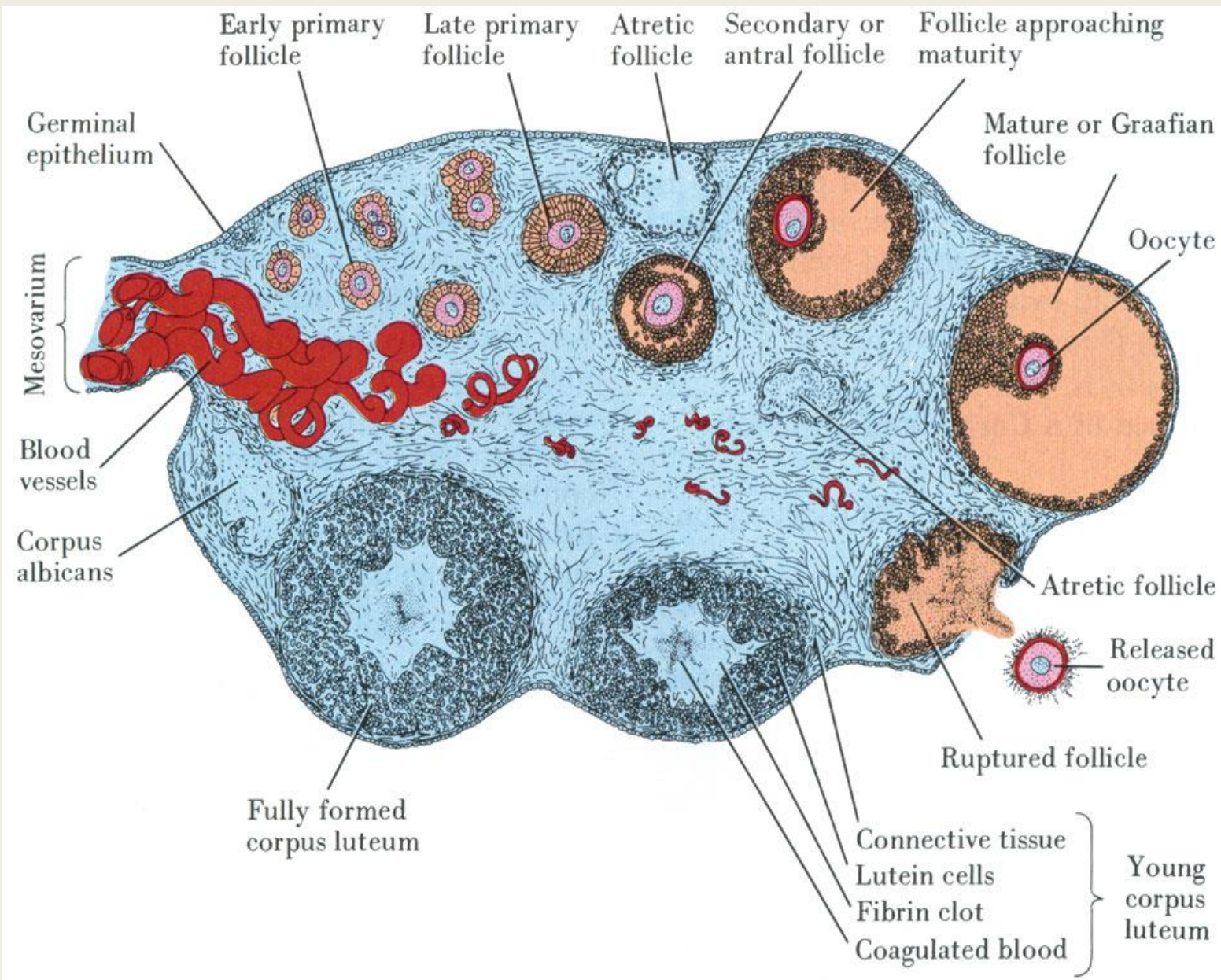
Vaječník

■ Folikuly

- *Různé stádium vývoje*

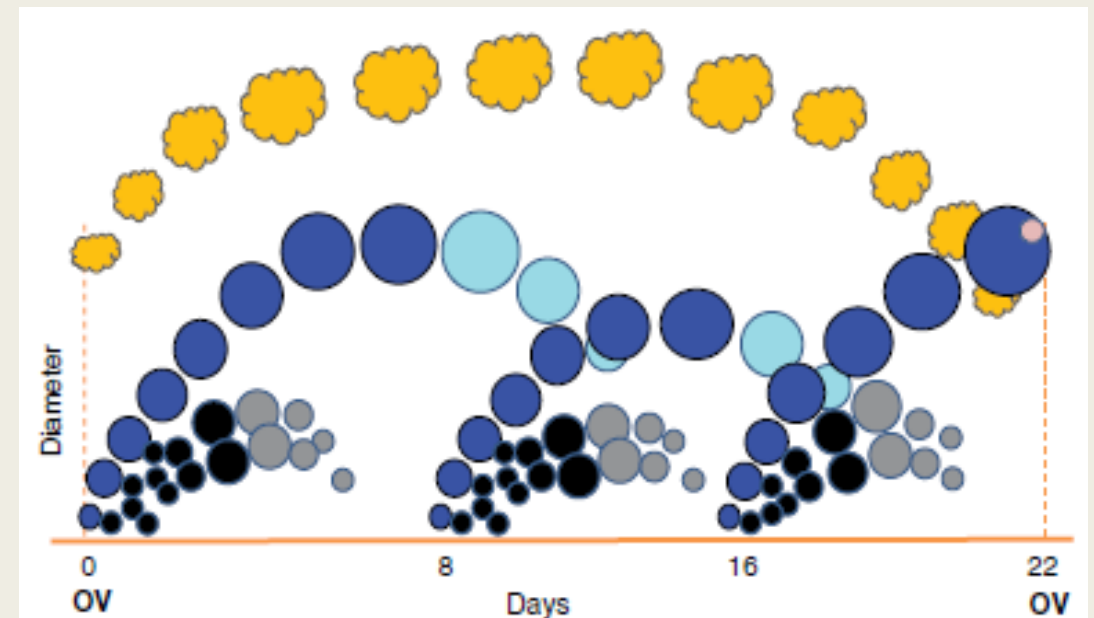
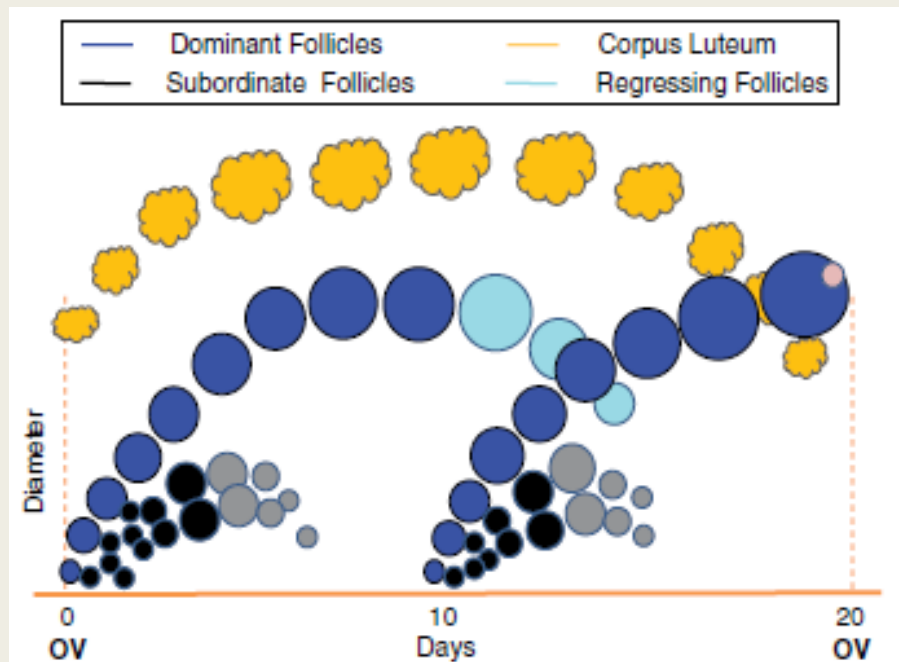
■ Žluté tělísko

- *Zaniká cca 16-18 den cyklu*



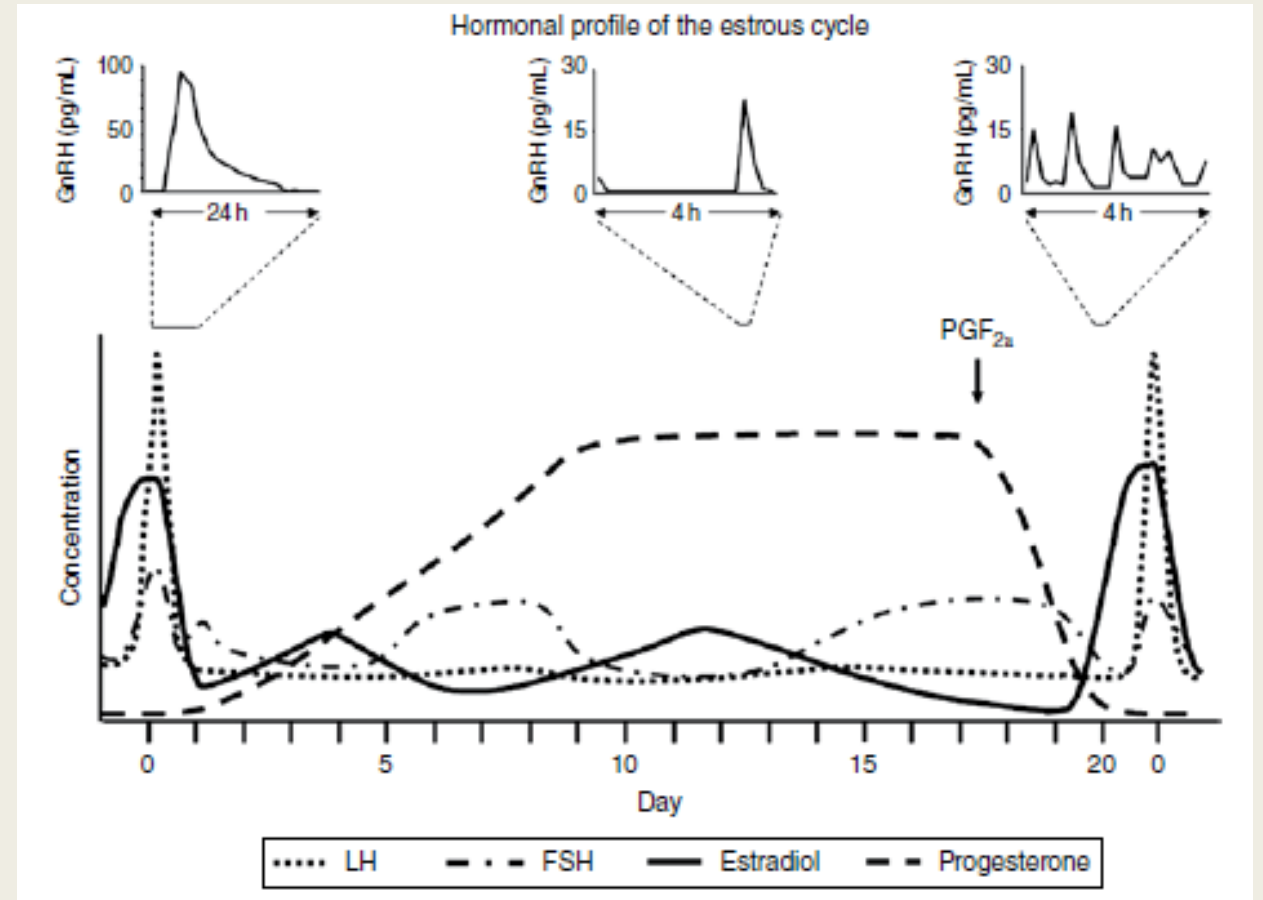
Estrální cyklus

- Průměrná délka 21 dní
- Délku určuje počet folikulárních vln: 95% cyklů se skládá ze 2-3 f. vln
- Folikulární vlna
 - Souběžně probíhající vývoj ovariálních folikulů na vaječnÍku



Folikulární vlna

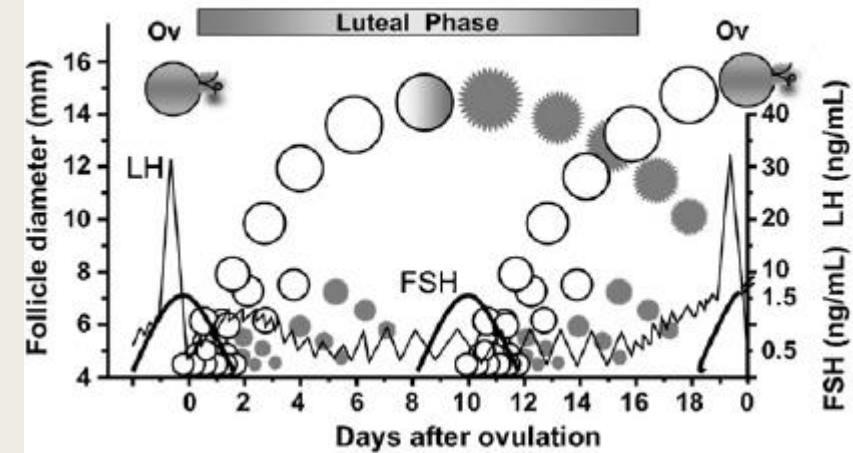
- Důležitá podpora hormonů
 - FSH, LH
- Lze je pozorovat během
 - *Prepubertální periody*
 - *Estrálního cyklu*
 - *Březosti*
 - *Anestru*



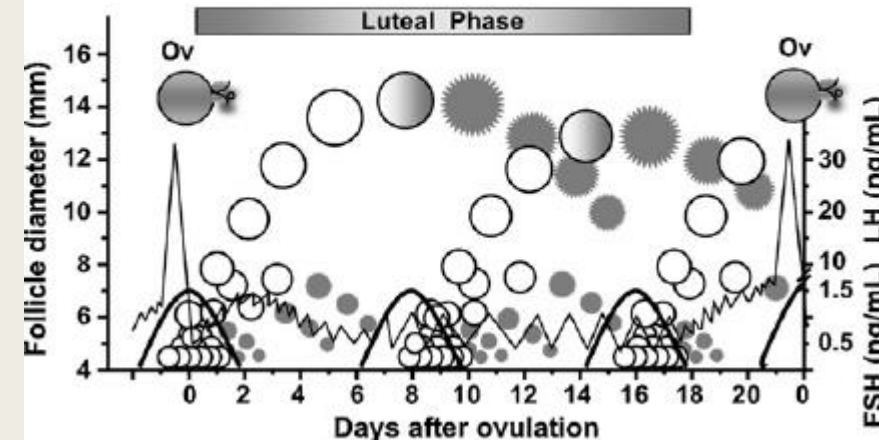
2- vs. 3-vlnný cyklus

| | | 2vlnný | 3vlnný |
|-------------------------------------|---------|----------|----------|
| délka říjového cyklu (dny) | | 19,8±1,4 | 23,1±4,1 |
| počátek růstových vln (den cyklu) | 1. vlna | 0,9±1,2 | 1,9±0,9 |
| | 2. vlna | 11,1±1,6 | 9,7±1,7 |
| | 3. vlna | | 18,3±3,8 |
| počet folikulů (ks) | 1. vlna | 3,6±1,5 | 3,7±2,1 |
| | 2. vlna | 3,3±1,4 | 2,7±0,9 |
| | 3. vlna | | 3,7±1,1 |
| velikost dominantního folikulu (cm) | 1. vlna | 1,4±0,2 | 1,3±0,2 |
| | 2. vlna | 1,5±0,2 | 1,1±0,1 |
| | 3. vlna | | 1,2±0,2 |
| velikost ovulačního folikulu (cm) | | 1,5±0,2 | 1,2±0,2 |

2-wave interovulatory interval



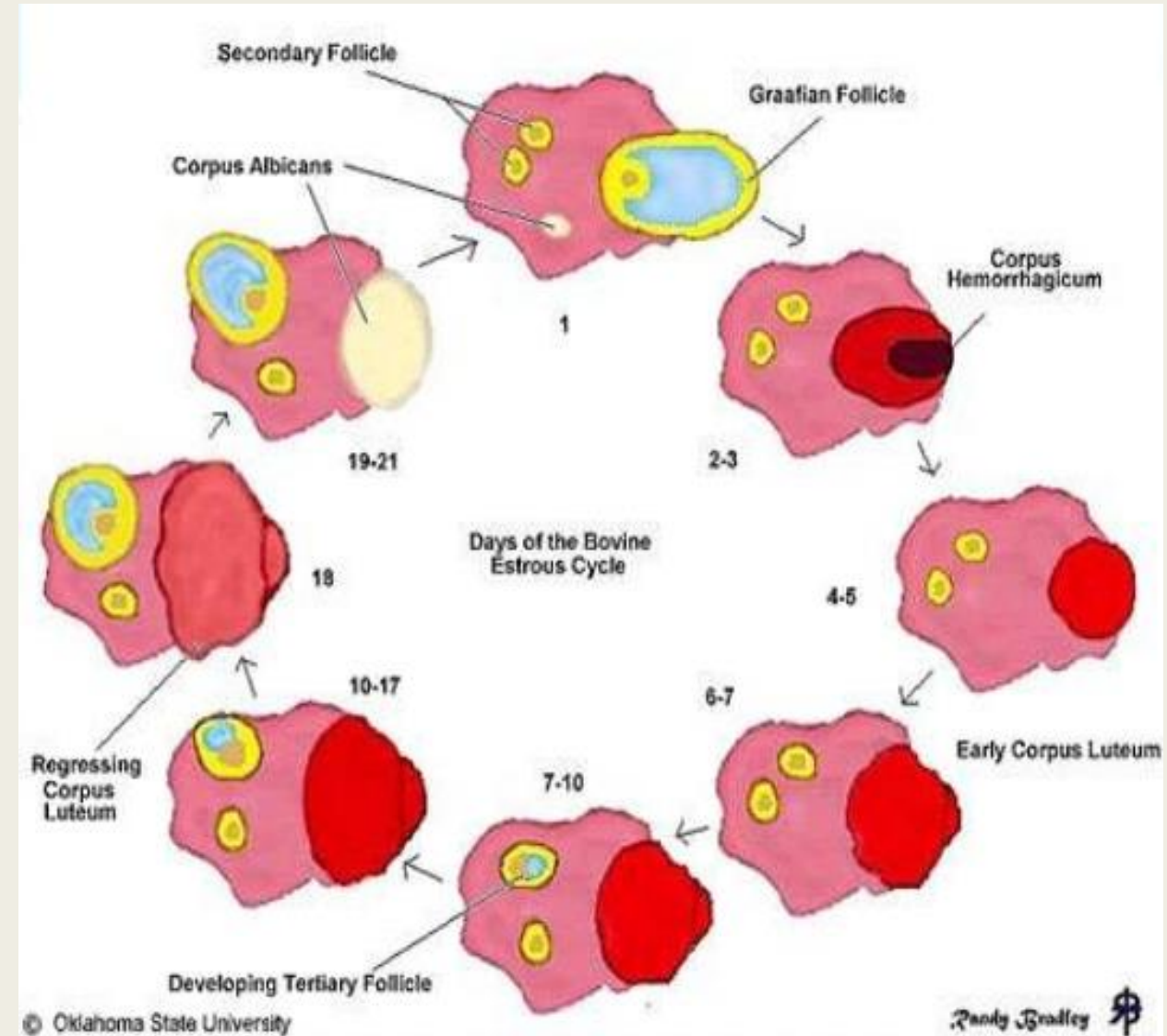
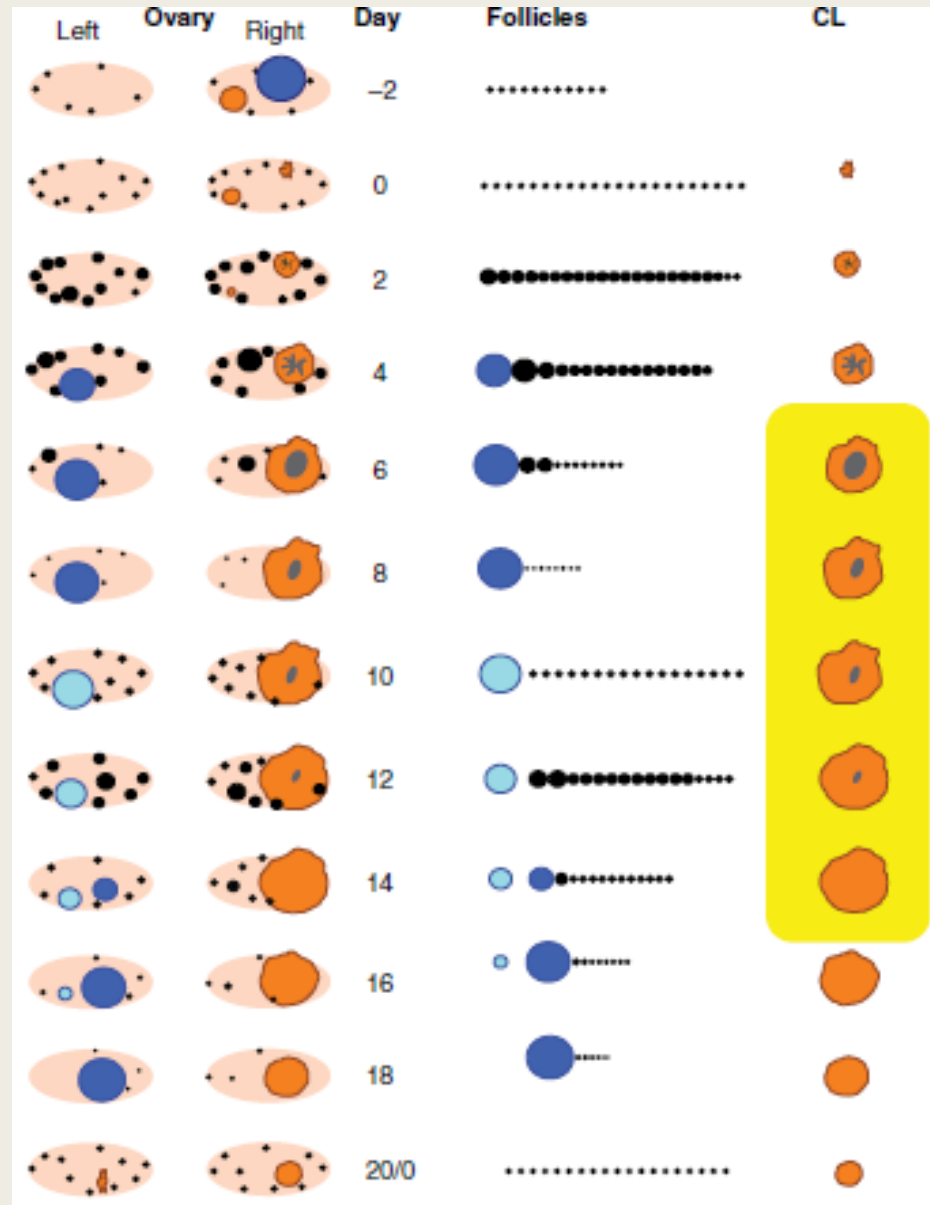
3-wave interovulatory interval



Jalovice vs. krávy

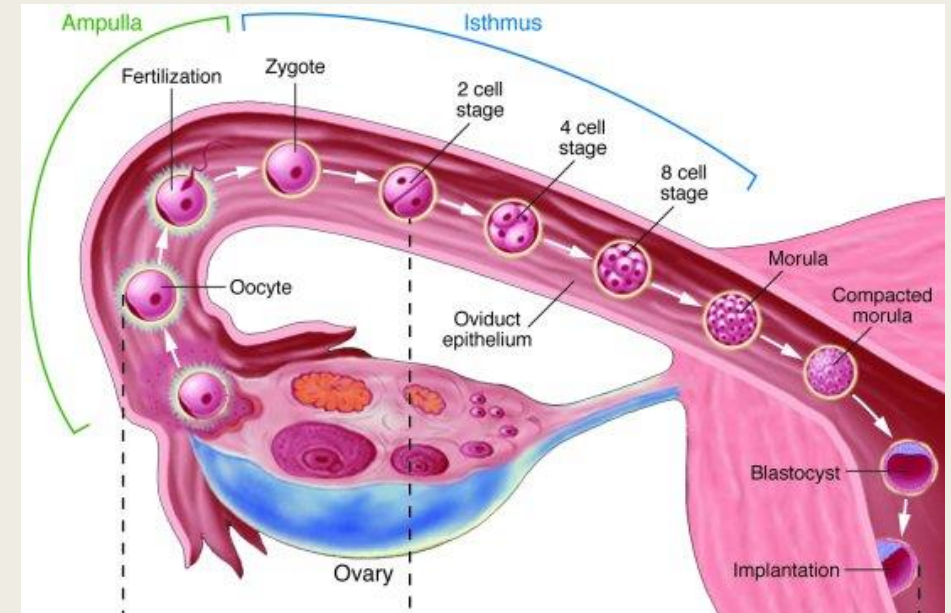
| | jalovice | krávy |
|-------------------------------------|----------|----------|
| délka říjového cyklu (dny) | 19,8±1,1 | 21,9±4,6 |
| počet folikulů (ks) | 3,0±1,1 | 4,1±1,8 |
| velikost dominantního folikulu (cm) | 1,3±0,2 | 1,5±0,3 |
| velikost ovulačního folikulu (cm) | 1,3±0,2 | 1,6±0,2 |

Co se děje na vaječnicích během říjového cyklu?

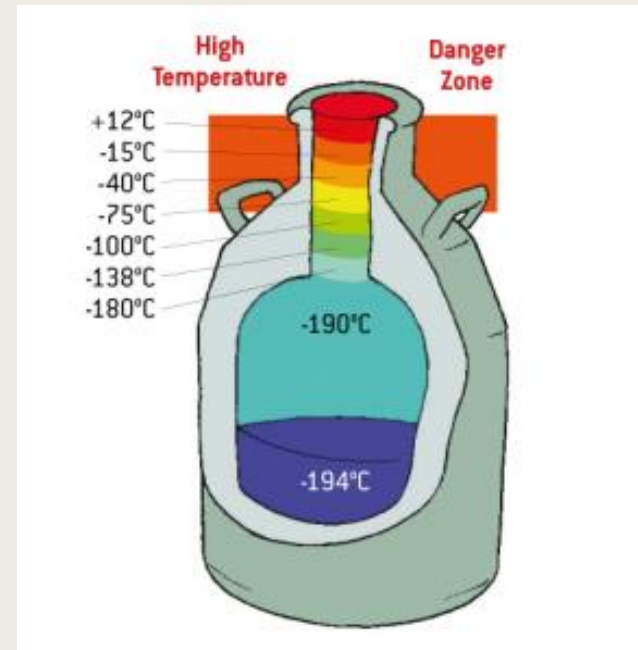


Úspěšné oplození...

- Pravidelná ovulace „normálních“ folikulů
- Oplození schopný oocyt

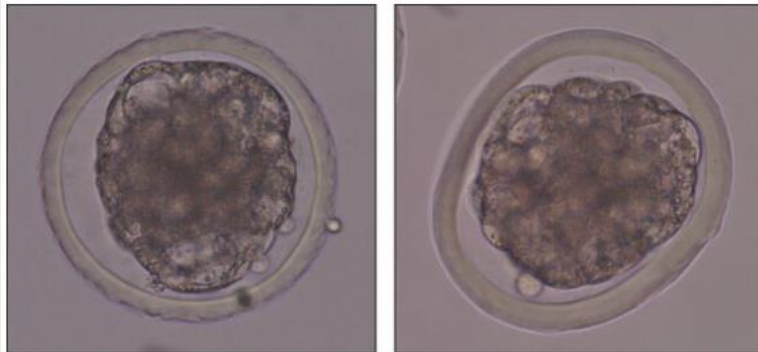


- Kvalitní ID a práce technika
 - Správné zacházení!!
 - Dostatek dusíku
 - Udržovaná inseminační aparatura

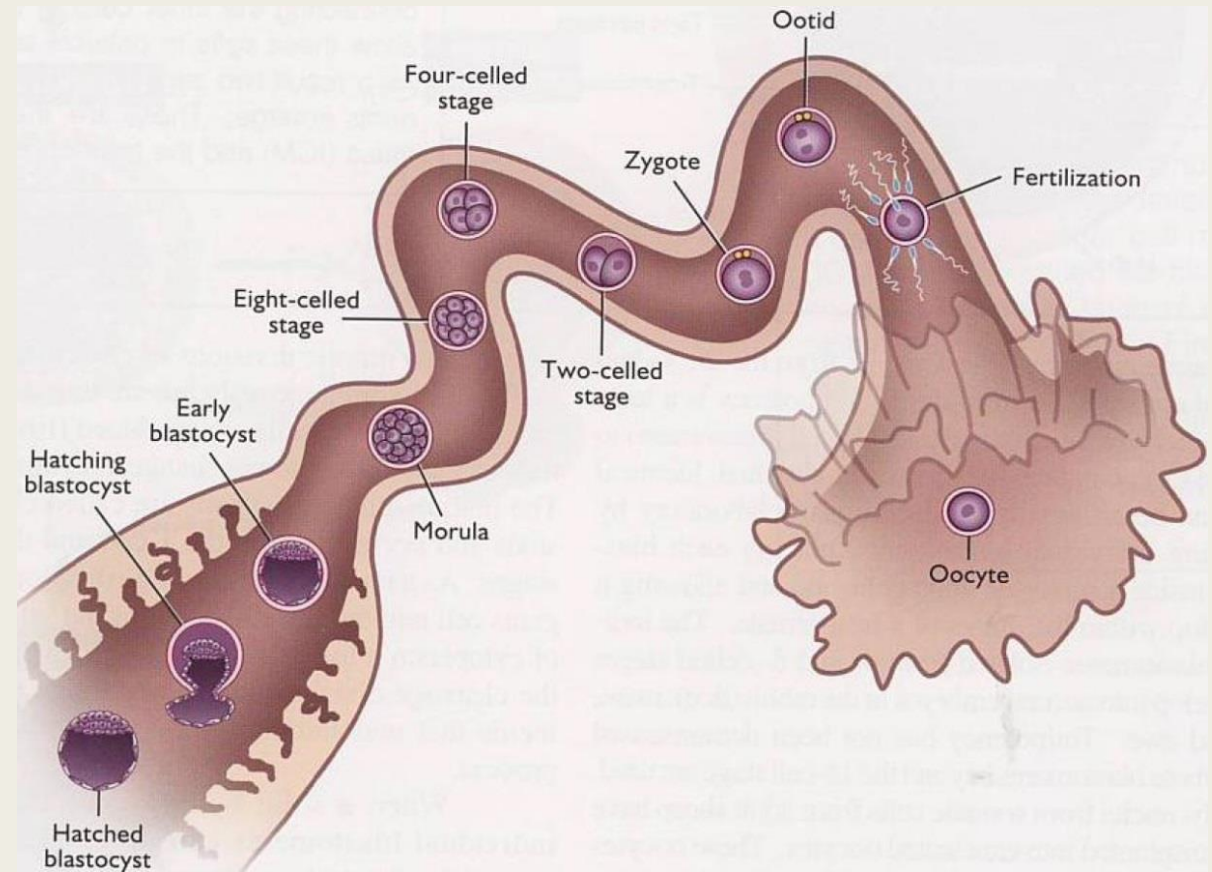
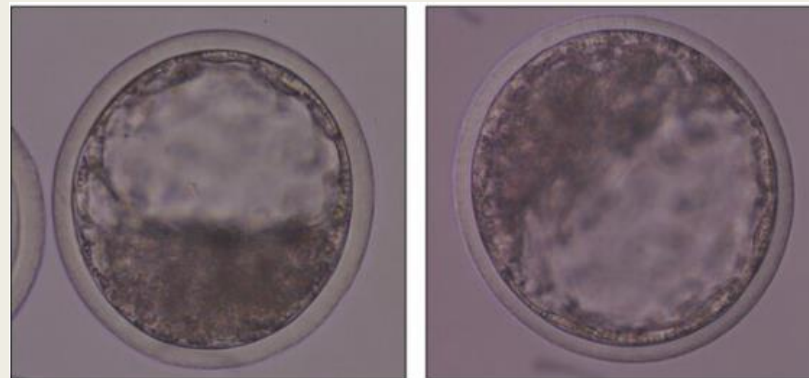


Vývoj embrya

- Začíná ve vejcovodu
- Pokračuje v děloze
- Pro ET
 - *morula*



- *blastocysta*

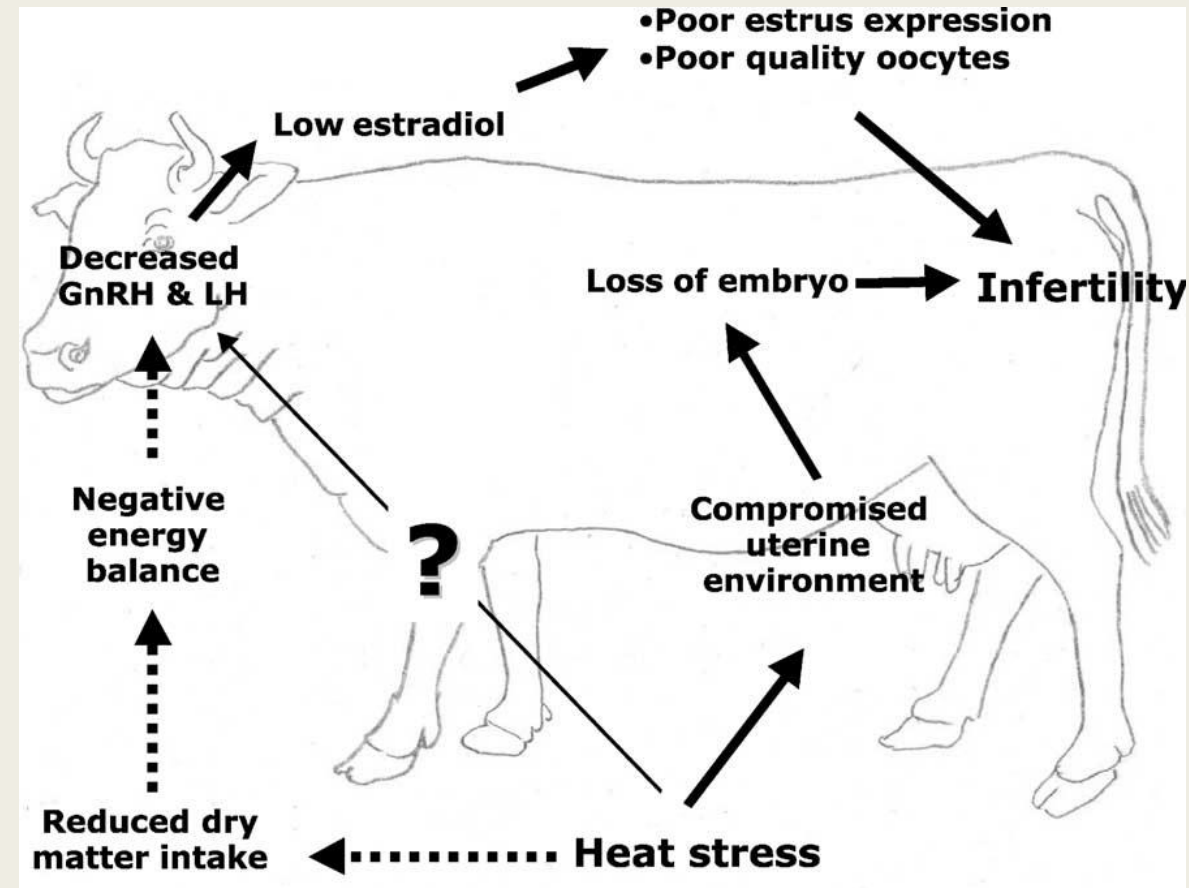


Kdy raději místo ET k vodě...

- Teplotní komfort krávy je kolem 10 °C

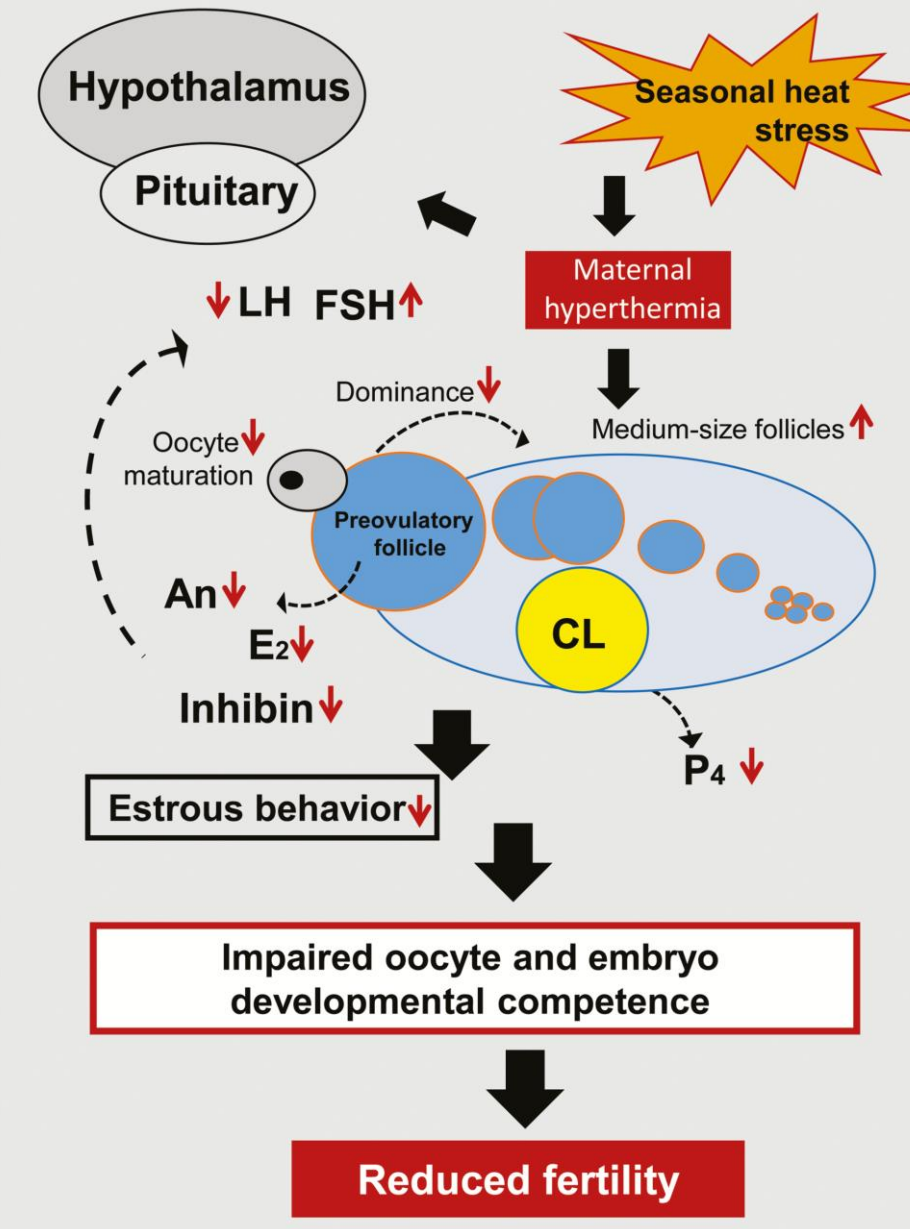
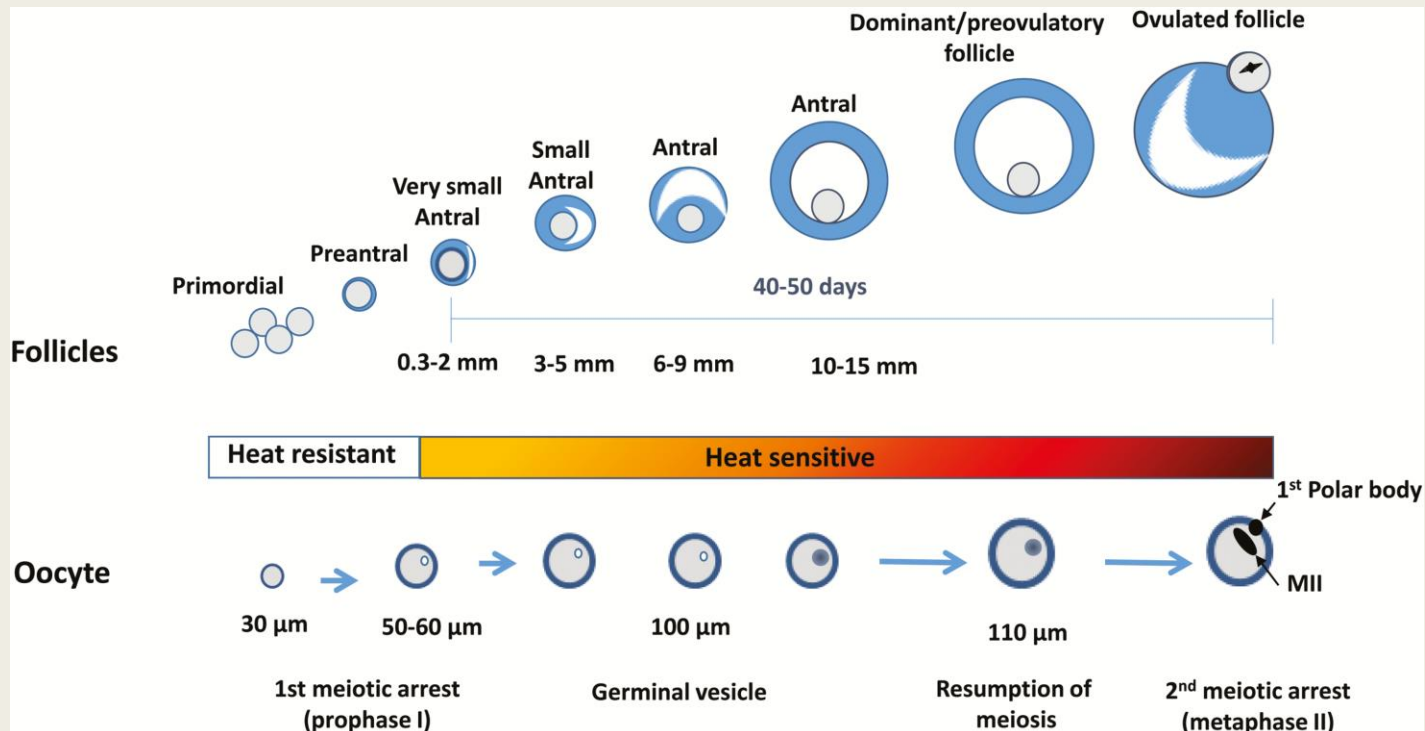
- 2022

- Počet jarních dní (**nad 20 °C**) celkem 143 dní = **4,6 měsíce**
- Počet letních dní (**nad 25 °C**) celkem 90 dní = **3 měsíce**
- Počet tropických (**nad 30 °C**) celkem 37 = **1 měsíc**



Tepelný stres

- **NEGATIVNĚ** ovlivňuje
 - *Hladiny hormonů*
 - *Intenzitu projevů říje*
 - *Růst folikulů*
 - *Vývojovou schopnost oocytů a embryí*



Poporodní období

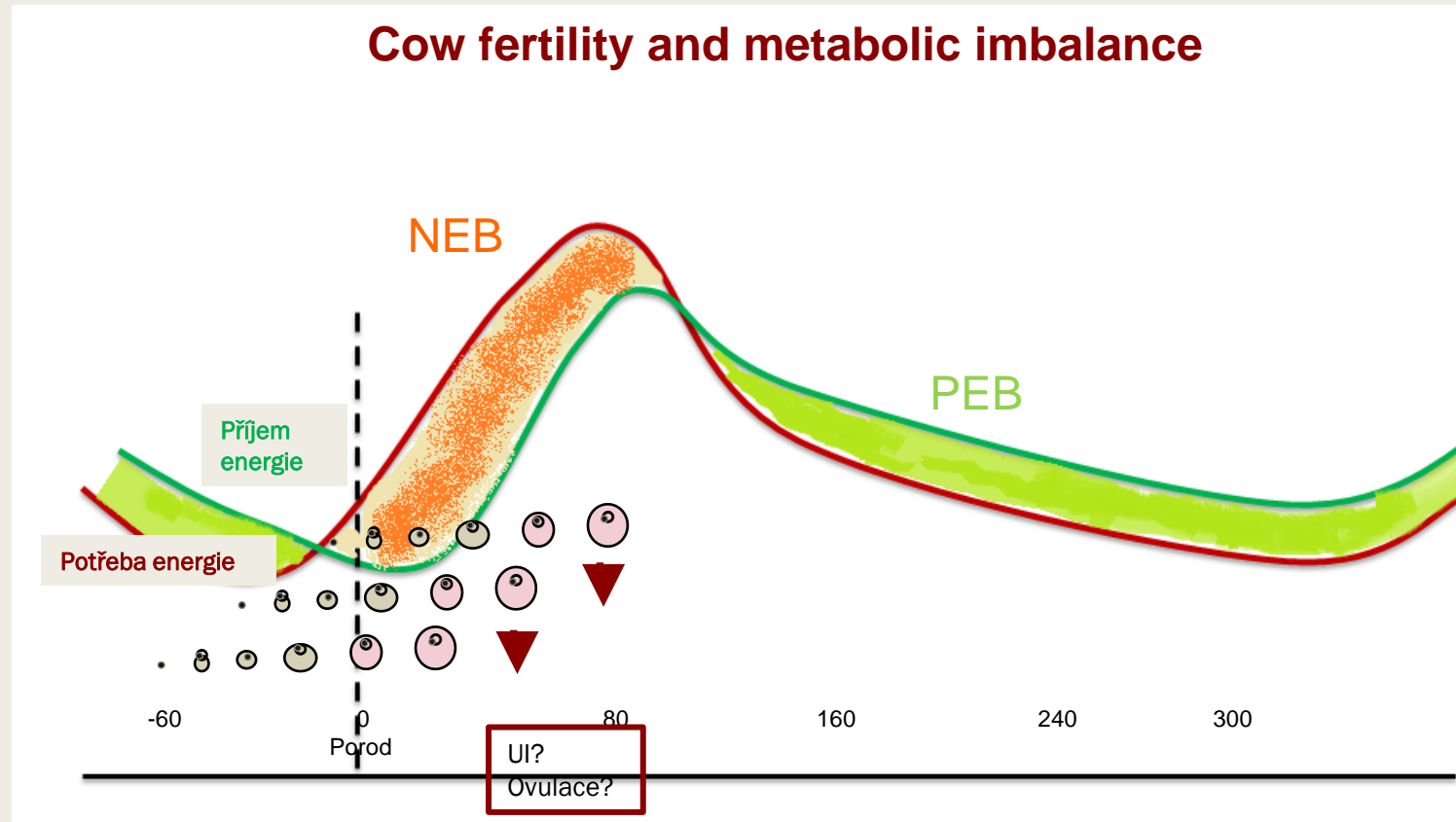
- Z pohledu produkce i reprodukce se jedná o zásadní období
- Porod, nástup laktace, zabřeznutí
- Porod
 - *Důležitý ve vztahu k „zdraví“ dělohy*
- Laktace
 - *Naplnění energetických požadavků zvířete*
- Zabřeznutí
 - *Úspěšnost většinou závisí na energetické bilanci a zdraví jedince*

Nástup ovariálních funkcí po porodu

- Vyžaduje regeneraci všech orgánů spojených s reprodukcí
- Stejně jako během estrálního cyklu probíhá ve vlnách
- Znovuzahájení fol. růstu je nezávislé na energetické bilanci zvířete
- U většiny krav se objevují středně velké fol. 5. den a velké fol. 10. den p.p.

- 1. ovulace
 - *Může nastat již během 2 týdnů p.p.*
- 2. ovulace
 - *Často k ní dochází po zkrácené luteální fázi*
 - *Plemenice by měly projevovat dostatečné říjové příznaky*
 - *Nemusí být následována pravidelným cyklováním*
 - anestrus

Časné poporodní období a kvalita oocytů



Výběr dárkyně embryí

- „ET neudělá z průměrné krávy dobrou, nebo z dobré lepší.“
- Normální reprodukční orgány
- Normální reprodukční „historie“ v poporodním období
 - *Především s ohledem na délku cyklů: 18-24 dní*
- Minimálně 60 dní po porodu (?)

- Kritéria (?)
 - *Pravidelné cykly v mladém věku*
 - *Ne více jak dvě inseminace na březost*
 - *Předchozí porod telete v období cca 365 denní interval*
 - *Bez problematických porodů nebo reprodukčních abnormalit*
 - *Bez konformačních nebo genetických defektů*



Jak je na tom celosvětově ET ?

Zdroj dat: IETS 2021

Celkový počet přenosuschopných E

| Region | Cattle | |
|-------------------|----------------|------------------|
| | IVD | IVP |
| Africa | 0 | 5,421 |
| Asia | 0 | 0 |
| Europe | 134,386 | 42,410 |
| North America | 215,745 | 764,650 |
| Oceania | 13,414 | 17,681 |
| South America | 22,829 | 690,856 |
| Total 2021 | 386,374 | 1,521,018 |
| Total 2020 | 361,728 | 1,156,422 |
| % Change | +6.8 | +31.5 |

Počet transferů

| Region | Cattle | |
|-------------------|----------------|------------------|
| | IVD | IVP |
| Africa | 0 | 5,382 |
| Asia | 0 | 0 |
| Europe | 121,376 | 21,975 |
| North America | 161,877 | 456,978 |
| Oceania | 8,968 | 17,936 |
| South America | 21,559 | 663,763 |
| Total 2021 | 313,780 | 1,166,034 |
| Total 2020 | 294,670 | 878,181 |
| % Change | +6.5 | +32.8 |

Jak je na tom celosvětově ET ?

Zdroj dat: IETS 2021

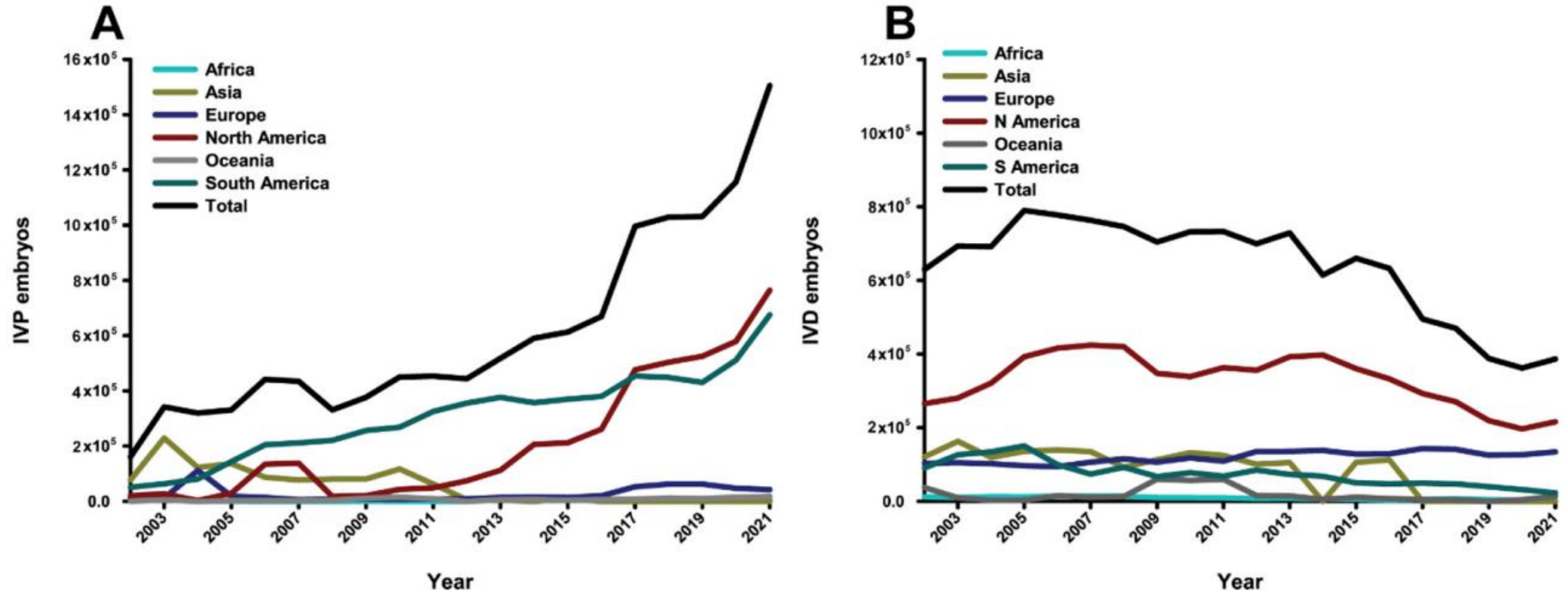


Figure 3. Number of embryos produced or collected in cattle in the period of 2002-2021, by continent. (A) *In vitro*-produced [IVP] embryos; (B) *In vivo*-derived [IVD] embryos.

Využití embryotransferu

- ET zasahuje do procesu reprodukce a šlechtění převážně vysokoužitkových jedinců
- Cíl je produkce více potomstva od vynikajících rodičovských párů a zkrácení generačního intervalu
- Získaná embrya od vysokoužitkových krav lze přenést do jalovic s nižší plemennou hodnotou
- Embrya lze získat i od jalovic a krav neschopných z různých důvodů donosit telata
- Zvýšení příjmu za prodej embryí

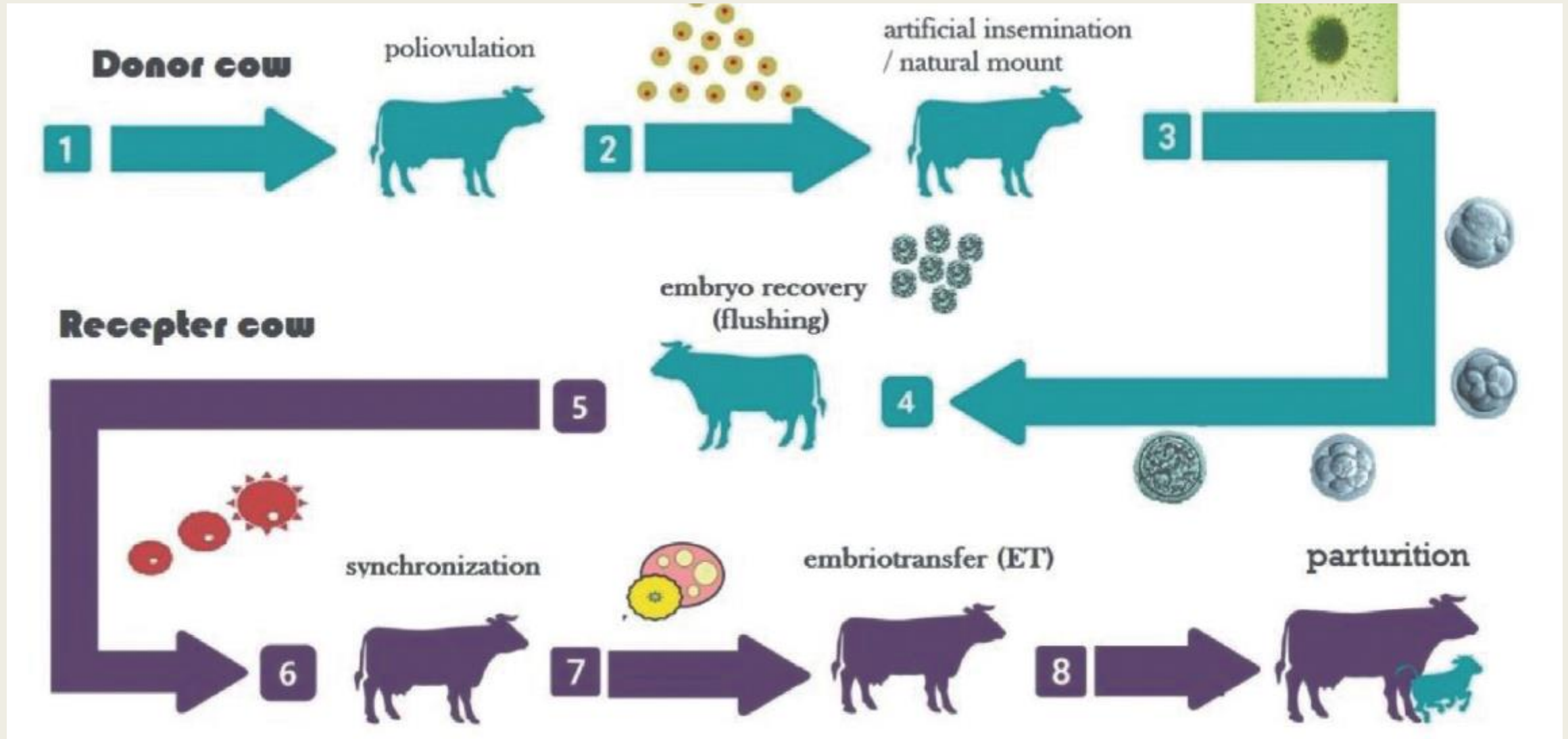


Využití ET

- Produkce plemenných býků od matek býků
- Možné řešení pro přebíhalky
- Embrya se transportují lépe než zvířata

- Získ embryí pro
 - *Genomické testování*
 - *Půlení embryí*

Fáze embryotransferu



ET harmonogram

- Jednotlivé kroky stejně důležité
- Nepodcenit správnou aplikaci
 - *Lepší když dělá zootechnik nebo vet*
- Příjemkyň nebývá stejně jako přenosuschopných embryí
 - *kryokonzervace*

I.

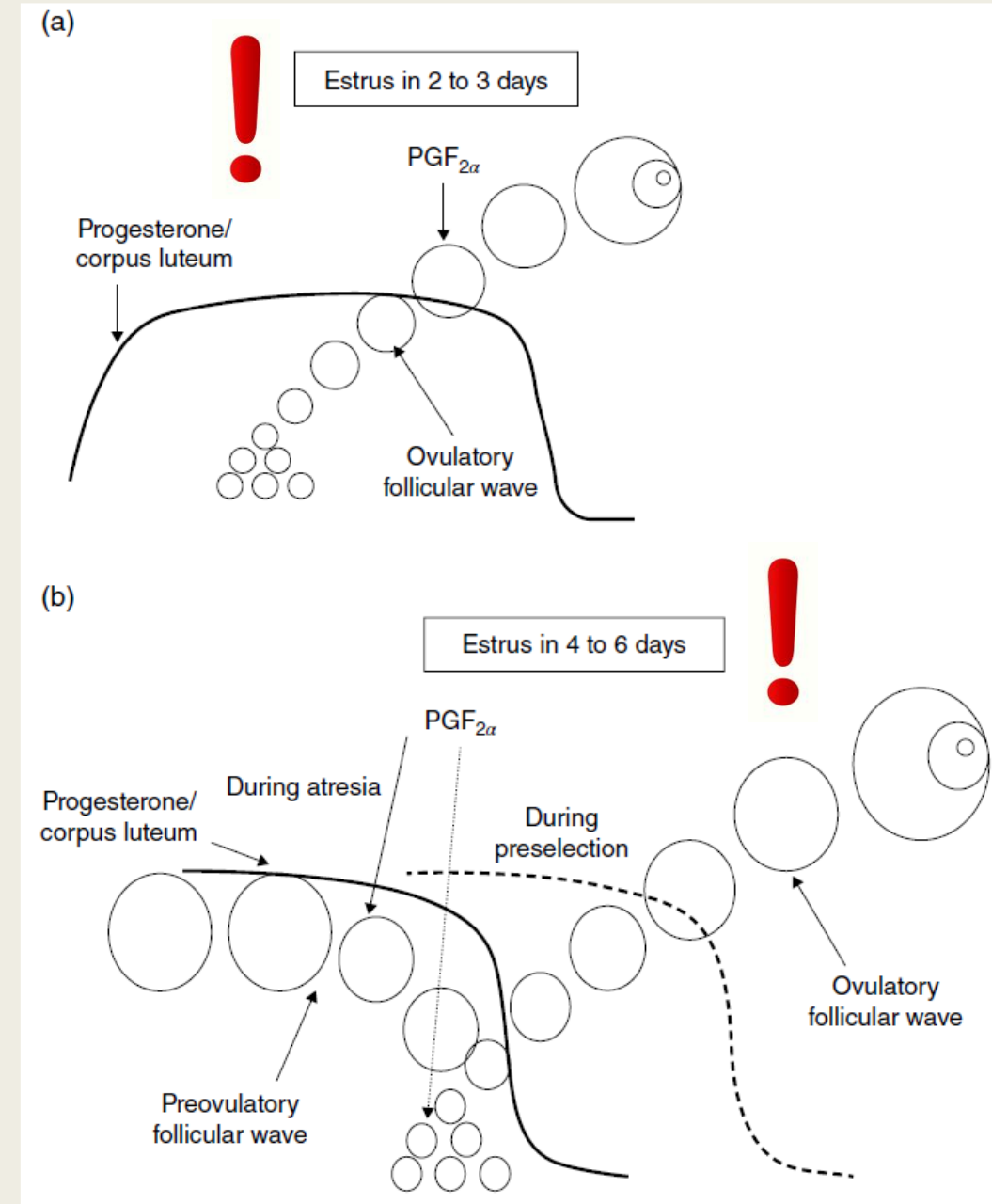
| Chovatel | | | | |
|--|---------------------------------|-------------------|-------------------------------|------------|
| Úkon | Dávkování a časový rozpis | | Základní schéma na CL 10. den | |
| Dárkyně | | | | |
| 1. Aplikace Oestrophanu (OE) | 3 ml | | 28.03.2023 | |
| 2. Aplikace Oestrophanu (OE) | 3 ml | | 11.04.2023 | |
| 3. Kontrola říje | | | 14.04.2023 | |
| 4. VYŠETŘENÍ CL (corpus luteum) | | | 24.04.2023 | |
| | | Ráno: 6-8 hod. | Večer: 18-20 hod. | |
| 5. Aplikace Plusetu (Folltropinu) | 2 (4) ml | | 24.04.2023 | |
| 6. Aplikace Plusetu (Folltropinu) | 1,5 (3) ml | | 25.04.2023 | |
| 7. Aplikace Plusetu (Folltropinu) + OE (3ml) | 1 (2) ml + OE | | 26.04.2023 | |
| 8. Aplikace Plusetu (Folltropinu) | 0,5 (1) ml | | 27.04.2023 | |
| 9. Inseminace + supergestran | celkem 2x | (8-10 hod.)(2 ml) | 18-20 hod. 2 ml | 28.04.2023 |
| 10. Inseminace | | 7-9 hod. | (14-16 hod.) | 29.04.2023 |
| 11. ODBĚR EMBRYÍ | 1000 ml transfermedium, 5 ml OE | | 05.05.2023 | |
| Příjemkyň | | | | |
| 1. Gynekologické vyšetření | | | | |
| 2. Aplikace Oestrophanu I. | 3 ml | | 14.04.2023 | |
| 3. Aplikace Oestrophanu II. | 3 ml | | 25.04.2023 | |
| 4. Kontrola říje (individuálně) | | | 28.04.2023 | |
| 5. PŘENOS EMBRYÍ | | | 05.05.2023 | |

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*
- Používá se „estrofan“ a jiné analogy
 - *Rozmezí 1. a 2. aplikace: 14 dní, po druhé aplikaci kontrola říše*

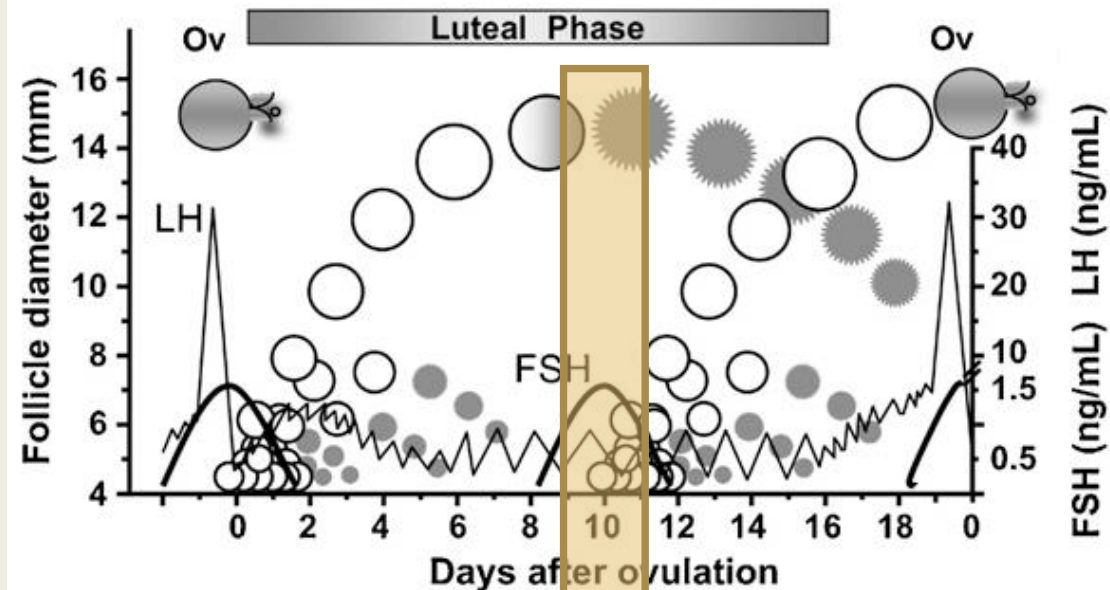


- **PROTOŽE NEMUSÍ NASTAT ZA 3 DNY!!!**

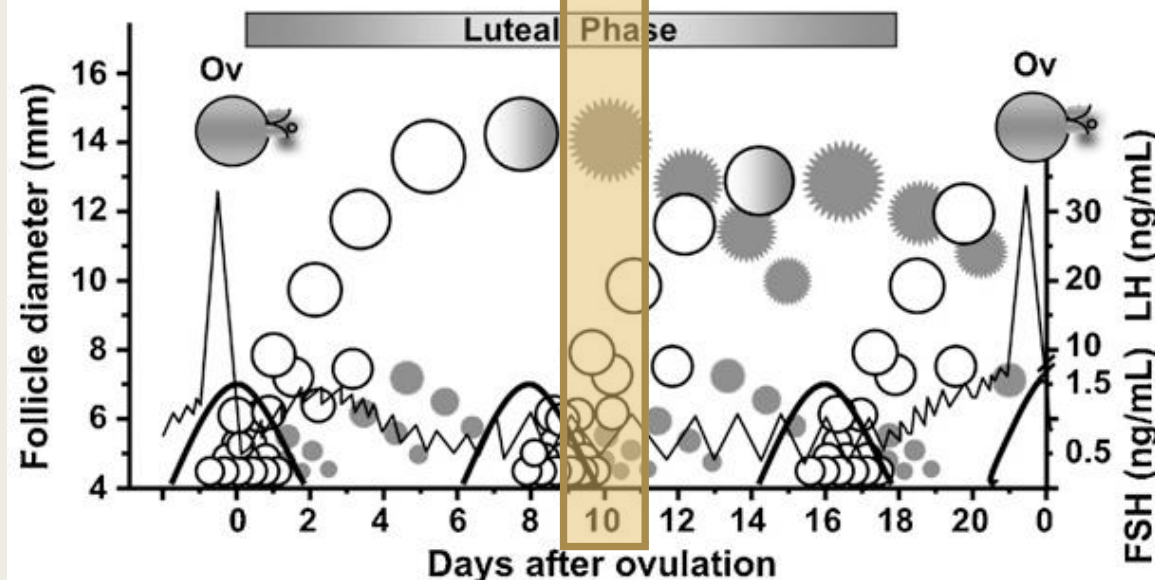


Superovulace

- Některé krávy reagují dobře, jiné ne
 - *Cca 80 % reaguje*
- Obvykle jednou až dvakrát před zapuštěním
 - *Doporučuje se vynechat dva cykly -> dlouhá SP*
- Dárkyně by měly být krávy bez
 - *Děložních infekcí*
 - *Ovariálních cyst*
 - *Nepravidelných cyklů*
 - *Zdravotních obtíží*



3-wave interovulatory interval



Kolik superovulací u jedné krávy?

- 292 opakovaných superovulací v rámci jedné laktace
- 40 ks holštýnek (8 924 kg, 7122 – 11 526 kg mléka)
- 42 ks českých strak (6 015 – 7 912 kg mléka)
- Od druhé laktace a dále
- Mezi jednotlivými superovulacemi 2-4 měsíce

Production of embryos from repeated superovulations of cows during one calving interval

Produkce embryí z opakovaných superovulací krav v průběhu jednoho mezidobí

J. ŽÍZLAVSKÝ¹, J. ŘÍHA³, F. URBAN², L. MÁCHAL¹, M. ŠTÍPKOVÁ²

Table 1. Embryo production from multiple superovulation

| Number of super ovulation | Number of cows | Number of recovered embryos | | | | Number of transferable embryos | | | | Proportion of transferable embryos (%) |
|---------------------------|----------------|-----------------------------|----------|----------|------|--------------------------------|----------|----------|-----------------|--|
| | | <i>x</i> | <i>s</i> | <i>v</i> | max. | <i>x</i> | <i>s</i> | <i>v</i> | variation range | |
| 1 n = 50 | 82 | 10.94 | 6.58 | 60.15 | 0–31 | 6.16 | 0.67 | 67.86 | 0–27 | 56.3 |
| 2 n = 50 | 82 | 8.32 | 7.88 | 94.71 | 0–30 | 5.51 | 0.91 | 114.34 | 0–25 | 66.2 |
| 3 n = 20 | 59 | 7.96 | 6.53 | 82.04 | 0–27 | 5.70 | 1.12 | 87.02 | 0–16 | 71.6 |
| 4 n = 14 | 40 | 7.35 | 6.27 | 85.31 | 0–22 | 5.16 | 1.21 | 86.24 | 0–13 | 70.2 |
| 5 n = 7 | 21 | 3.56 | 3.52 | 98.88 | 0–9 | 2.98 | 1.20 | 107.38 | 0–8 | 83.7 |
| 6 n = 14 | 8 | 2.82 | 2.72 | 96.45 | 0–7 | 2.01 | 1.02 | 142.29 | 0–6 | 71.3 |
| Total | – | 6.82 | 5.58 | 86.27 | 0–31 | 4.59 | 1.02 | 100.86 | 0–25 | 67.3 |

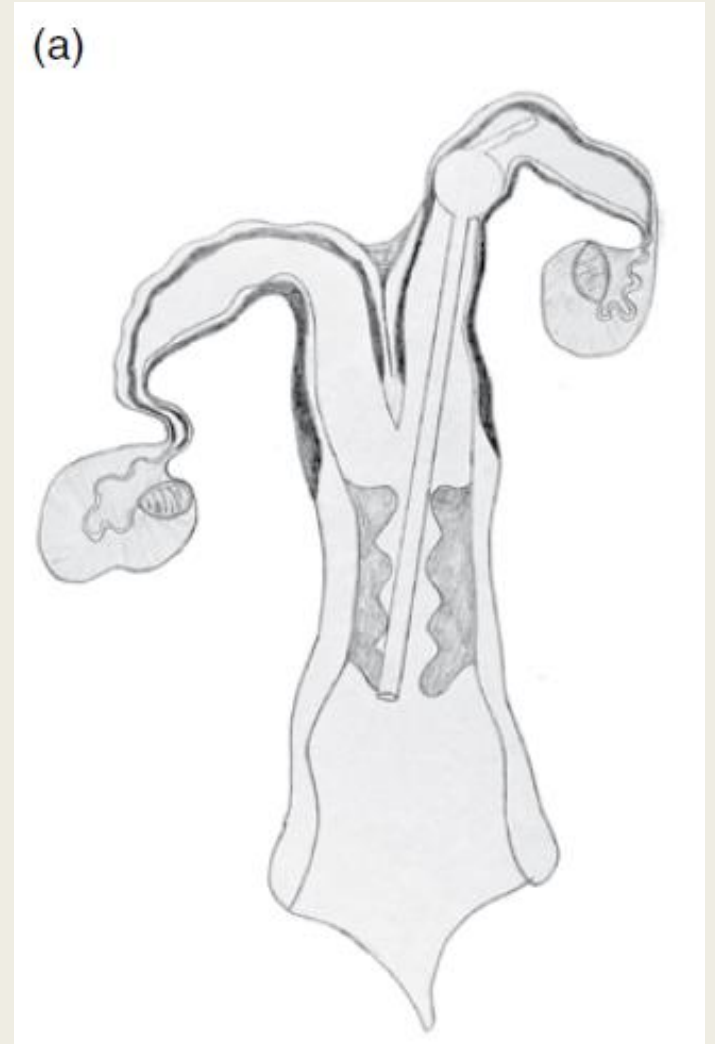
Výplach embryí z děložního rohu

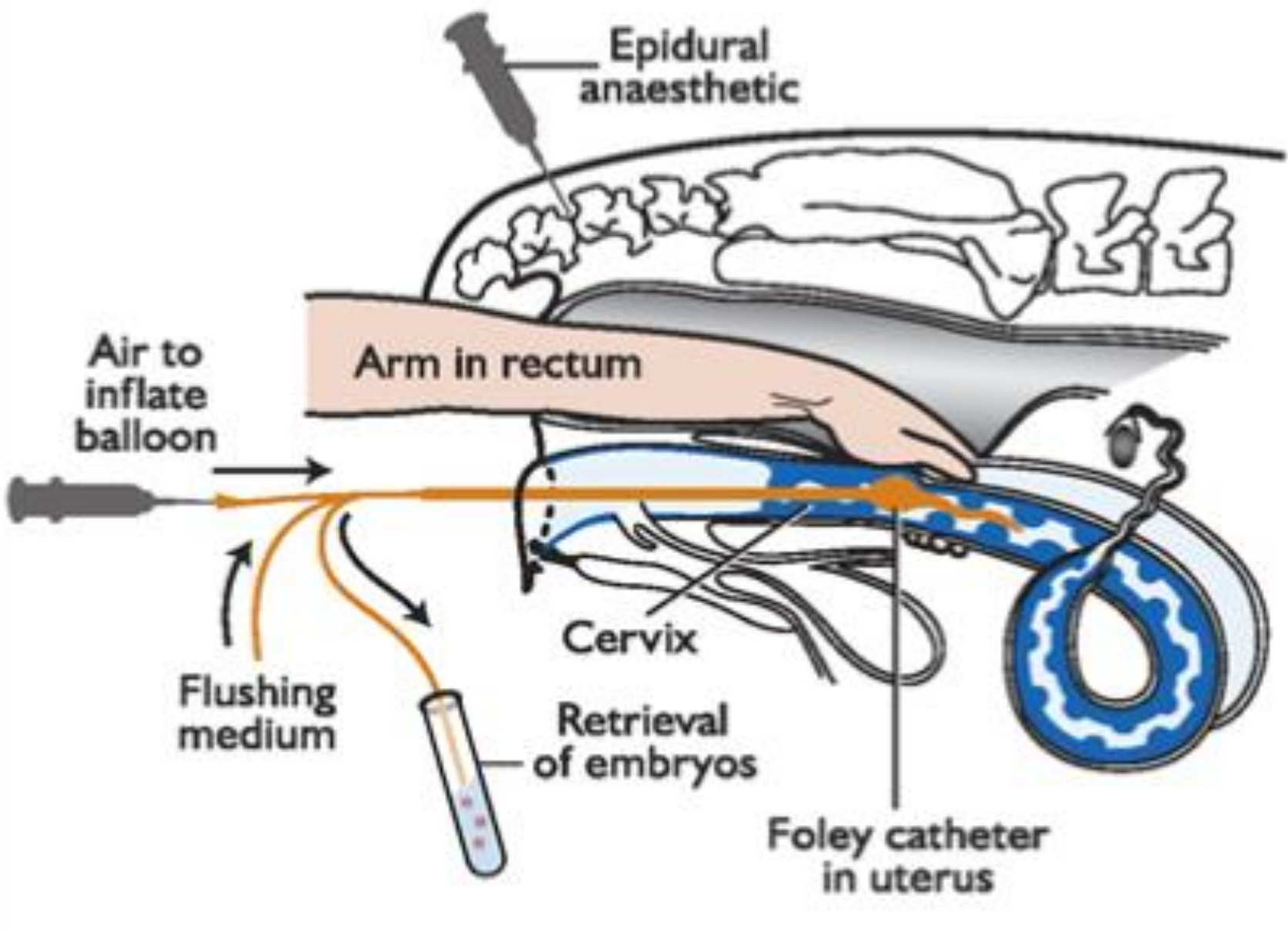


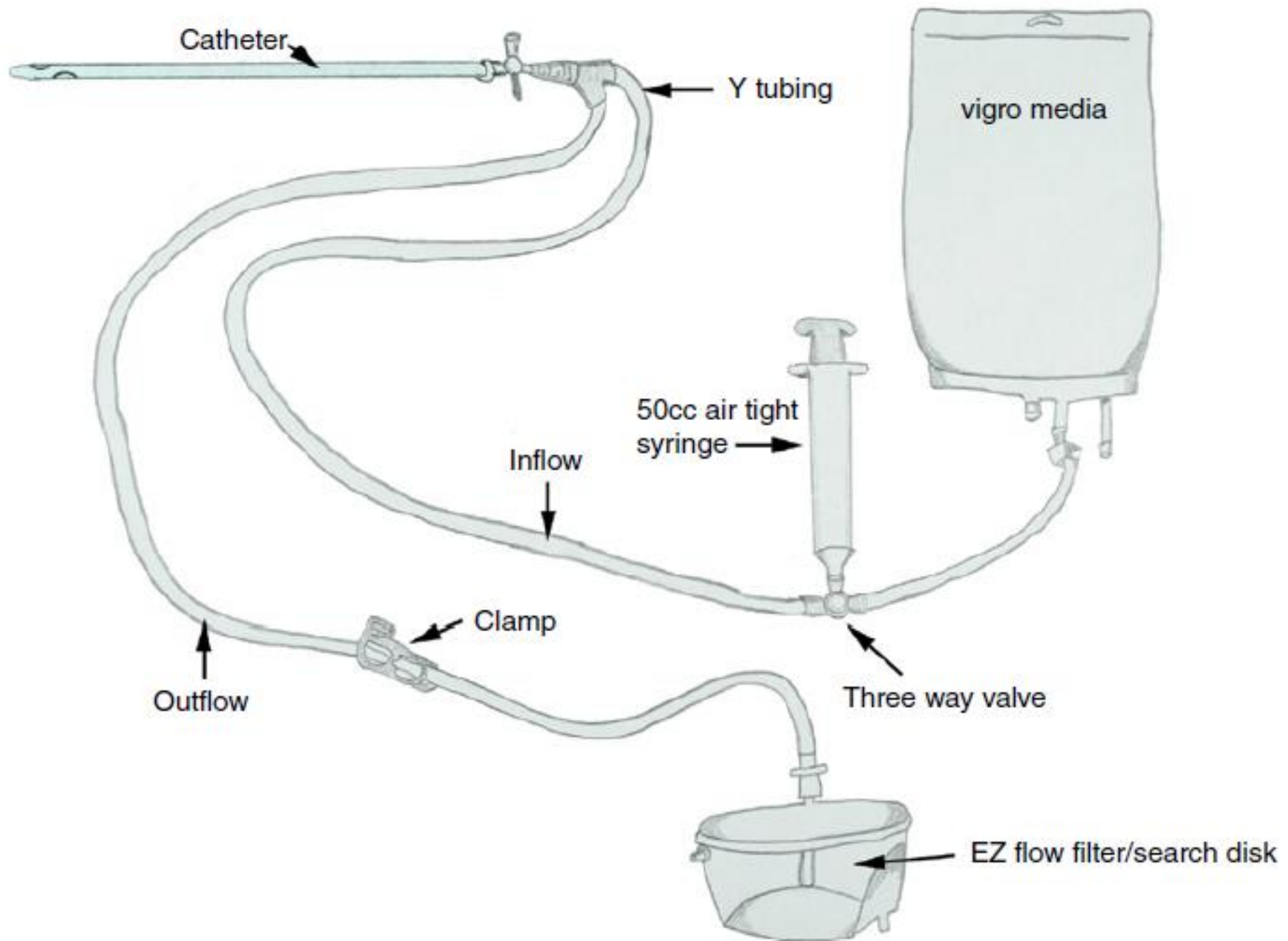
- Nechirurgický zákrok pod lokální anestezí
- Použití sterilních, jednorázových pomůcek, embryonálních filtrů
- Synteticky vyrobených vyplachovacích médií s přídavkem ATB
- Atraumatický proces trvající co nejkratší dobu s co největším efektem vybavení embryí z rohů děložních
- Ošetření dárkyně po odběru

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





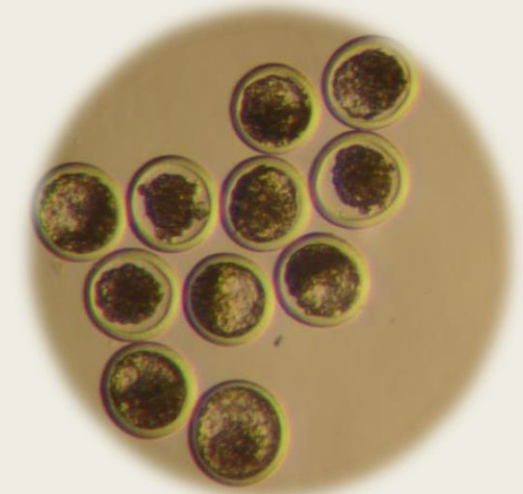


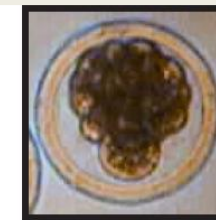
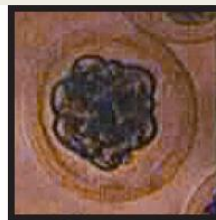
Výplach systémem „dovnitř“ a „ven“



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



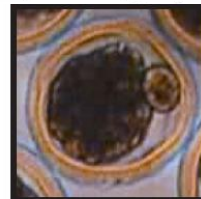
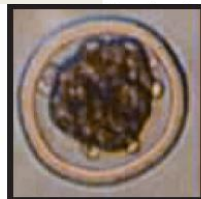
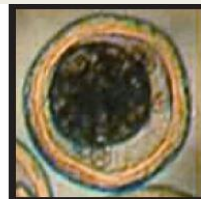
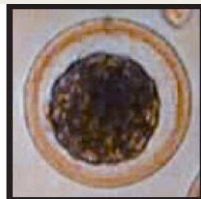
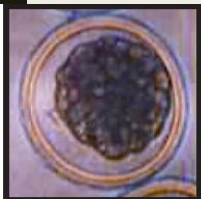


Cycle day: 6.5
Stage Code: 3
Quality Code: 1

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



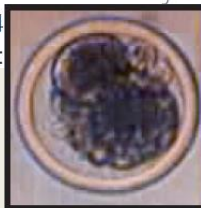
Cycle day: 7
Stage Code: 4
Quality Code: 1

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

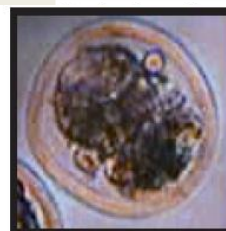
Cycle day: 7



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

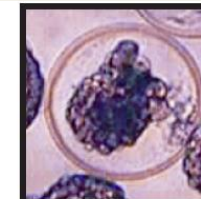
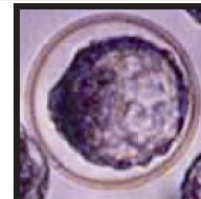
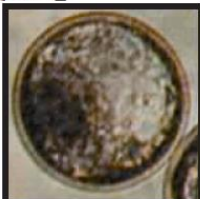


Cycle day: 7
Stage Code: 4
Quality Code: 2

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



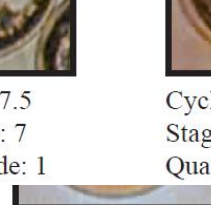
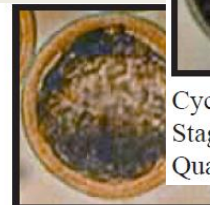
Cycle day: 7.5
Stage Code: 7
Quality Code: 1

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 zárodku při řízené teplotě – Holding medium, speciální udržovací média-do 24 hod.
- Kryokonzervace hlubokým mražením na -196°C dlouhodobá konzervace
 - *1,5M EthylenGlycol*
 - *10% Glycerol*
- Vitřifikace

Protokoly k embryotransferu

| | |
|----------|--|
| Datum ET | 19.01.14 |
| Majitel | CHD Impuls |
| Adresa | Bohdalec 122, 592 55 Bobrová |
| Chovatel | ZD Kožichovice |
| Adresa | Kožichovice 43, Třebíč 674 01; IČ: 00139718; DIČ00139718 |

| | | | |
|------------------|----------------------|--------------------------|------------|
| Druh zvířete | Bo | Číslo hospodářství D | 6104189974 |
| Dárkyně | | Plemeno | C |
| Datum narození | 14.5.2006 | Léčivé přípravky | |
| Jméno | | Transfermedium 1000 ml | Vel. OV |
| Kráva/ Jalovice | 1 | Oestrophan 5 ml, Procaln | Počet CL |
| Ušní číslo | CZ 000 291 903 - 903 | PO | 2 |
| Datum říje (ins) | 12.1.2014 | LO | 1 |
| | | 2% 4 ml | 1 |

| | | | | |
|--------------------|---------|------------|--------|----------|
| Číslo-registr býka | MOR 229 | Jméno býka | MANTON | Sexace N |
|--------------------|---------|------------|--------|----------|

| | | | |
|--------------|---|--------------|----------|
| Embrya | | SUPEROVULACE | |
| Celkem | 2 | Datum | 08.01.14 |
| Neoplozená | 0 | Den Cyklu | 10 |
| Degenerovaná | 1 | Preparát | Pluset |
| Použitelná | 1 | Dávka (ml) | 10 |
| Přeneseno | 1 | | |
| Zmrazeno | 0 | | |

| Pol/Přijemkyně | C.L. | Embrya | | Č.hospodářství | G-- | Datum přenosu | K/J (1/3) |
|----------------|----------------------|--------|---|----------------|------------|---------------|-----------|
| 1. | CZ 000 504 181 - 961 | LO | 4 | 1 | 6104189970 | 19.1.2014 | 3 |
| 2. | | | | | | | |
| 3. | | | | | | | |
| 4. | | | | | | | |
| 5. | | | | | | | |
| 6. | | | | | | | |
| 7. | | | | | | | |
| 8. | | | | | | | |
| 9. | | | | | | | |

- O odběru
- Přenosu
- Konzervaci
- Mezinárodní protokoly pro prodej embryí
- Soupisy ET (Plemdat)

| Soupis ET 001/2014 | | | | | | | | | | | | | | Typ věty | | 9 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|---|------|----------|-----------------------------|---|-----------------------------|---|-------|-------|-----------------------------|-----|----------|-----------------------------|--------------|----------|------|-------|---------------|-------|-------|-------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Realizační tým: Střední škola zemědělská a veterinární Lanškroun 53790093 | | | | | | | | | | | | | | | | 58 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Chovatel: ZD Kožichovice | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Kraj | A | 1-2 | 6 | 1 | Plemeno | | | | Datum ET | | | | Původ embrya | | | | Datum otelení | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | Identifikační číslo zvířete | | | | Identifikační číslo zvířete | | | | Matka | | Otec | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Hospodářství | Stáj | Kod země | Identifikační číslo zvířete | | | | Den | měsíc | rok | čas | Kód země | Identifikační číslo zvířete | | | | Linie | Reg číslo | Den | měsíc | rok | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| B | C | D | E | | | | F | G | H | I | J | K | | | | L | M | N | O | P | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 3-4 | 9-10 | 11-12 | 13-24 | | | | 25-26 | 27-28 | 29-30 | 31 | 32-33 | 34-45 | | | | 46-48 | 49-51 | 52-53 | 54-55 | 56-57 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 0 | 4 | 1 | 8 | 9 | 9 | 7 | 0 | C | Z | 0 | 0 | 0 | 1 | 5 | 0 | 4 | 1 | 8 | 1 | 9 | 6 | 1 | 1 | 9 | 0 | 1 | 1 | 4 | 3 | C | Z | 0 | 0 | 0 | 2 | 3 | 3 | 9 | 0 | 3 | 9 | 6 | 1 | 1 | 9 | 0 | 2 | 2 | 9 |

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 dominantního folikulu

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

Effect of DFR on MOET outcome

| Donor | Treatment | MOET sessions (<i>n</i>) | Total ova/session (<i>n</i>) | Viable embryos ¹ / session (<i>n</i>) | Viable embryos/ total ova (%) |
|---------------------------|-----------|----------------------------|--------------------------------|--|-------------------------------|
| Heifers (<i>n</i> = 193) | Control | 236 | 6.7 ± 0.5 | 4.0 ± 0.4 | 60 ± 4 |
| | DFR | 76 | 7.0 ± 1.0 | 4.3 ± 0.6 | 68 ± 7 |
| Cows (<i>n</i> = 60) | Control | 85 | 5.9 ± 0.4 ^a | 3.9 ± 0.4 ^a | 58 ± 3 ^a |
| | DFR | 51 | 7.6 ± 0.6 ^b | 5.4 ± 0.5 ^b | 76 ± 5 ^b |

Within group of donor values within a column with superscript letters are significantly different (SAS statistical program, $P < 0.05$; corrected means ± S.E.M.).

¹ Transferable embryos (IETS quality 1 and 2).

Výtěžnost ET

IETS EVROPA 2021

- 22 277 výplachů
- 208 521 embryí (zahrnutý všechny vývojové stádia)
- 134 386 přenosuschopných embryí

- 9,4 embrya na výplach
- 6 přenosuschopných embryí na výplach

ČR 2022

- 410 výplachů
- 2939 embryí
- 2043 přenosuschopných embryí

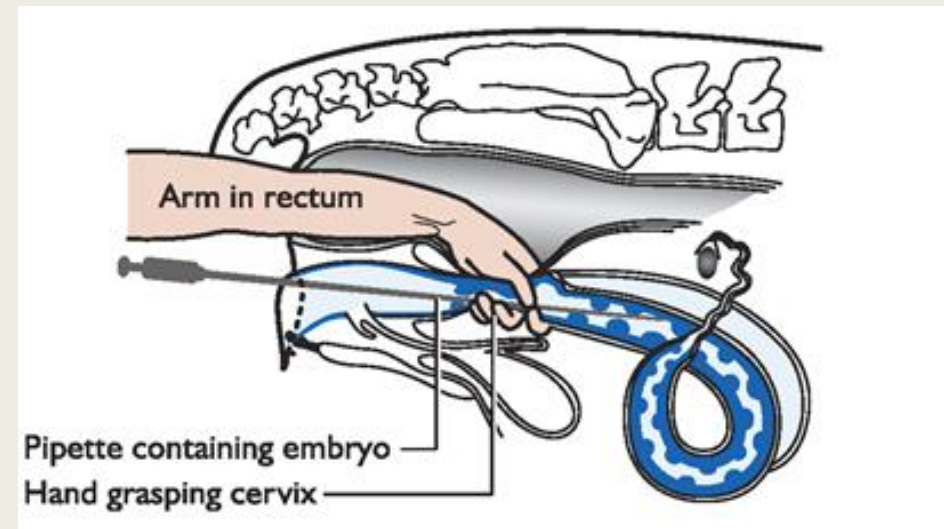
- 7,2 embryí na výplach
- 5,0 přenosuschopných embryí

Výběr příjemkyně

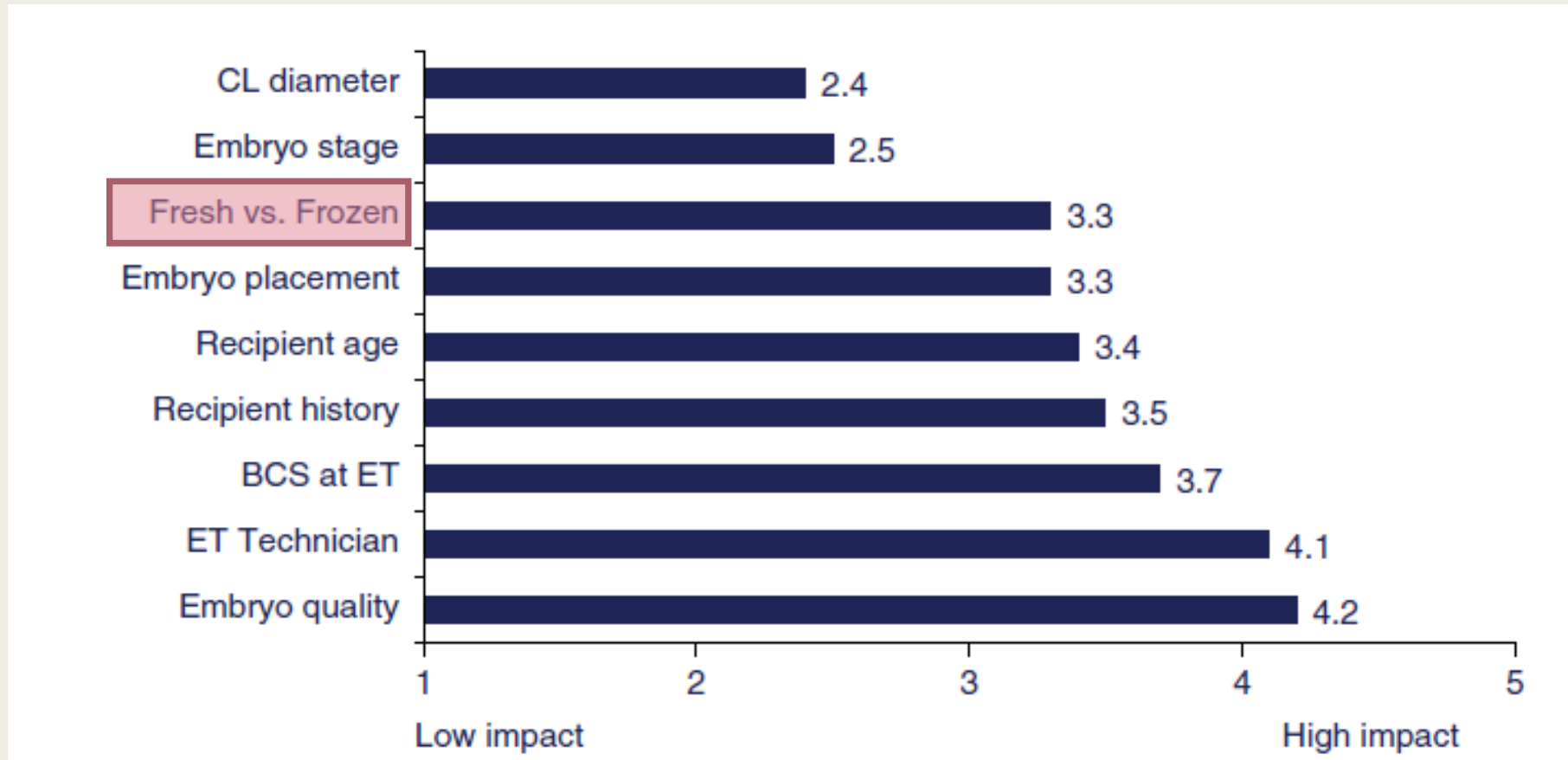
- Lepší připravit více příjemkyň
- Kráva nebo jalovice?
 - *Jalovice lepší zabřezávání X použitý býk a snadnost telení*
 - *Krávy jistější volba, druhá třetí laktace...?*
- Zdravotní stav
 - *Ideálně: zdravá v průběhu předchozího půl roku*
- BCS
 - *2,5 – 3,5 (pokud mimo, pak se zabřezávání snižuje)*
- 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
- Tolerance různé fáze cyklu dárkyň a příjemkyň poměrně malá (den)
- Přenos čerstvých a konzervovaných embryí stejné kvality cca – 10% zabřezlých



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 |

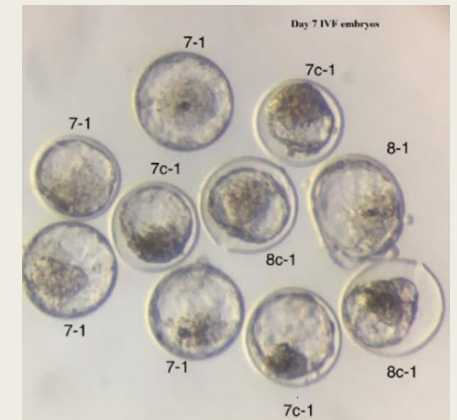
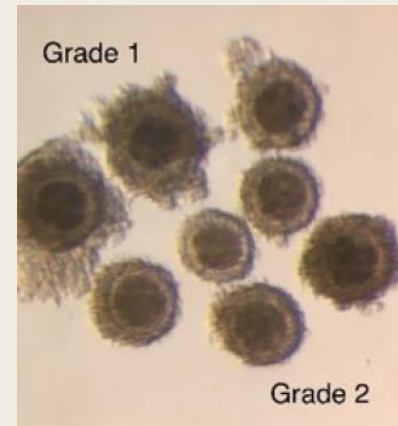
AI – artificial insemination; CIDR – controlled internal drug release; CL – corpus luteum; EB – estradiol benzoate; eCG – equine chorionic gonadotropin; ET – embryo transfer; IVF – *in vitro* fertilisation; TAI – timed artificial insemination; TET – timed embryo transfer

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



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*

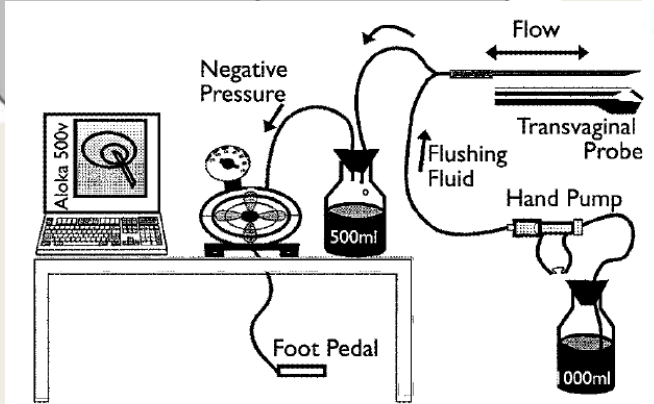
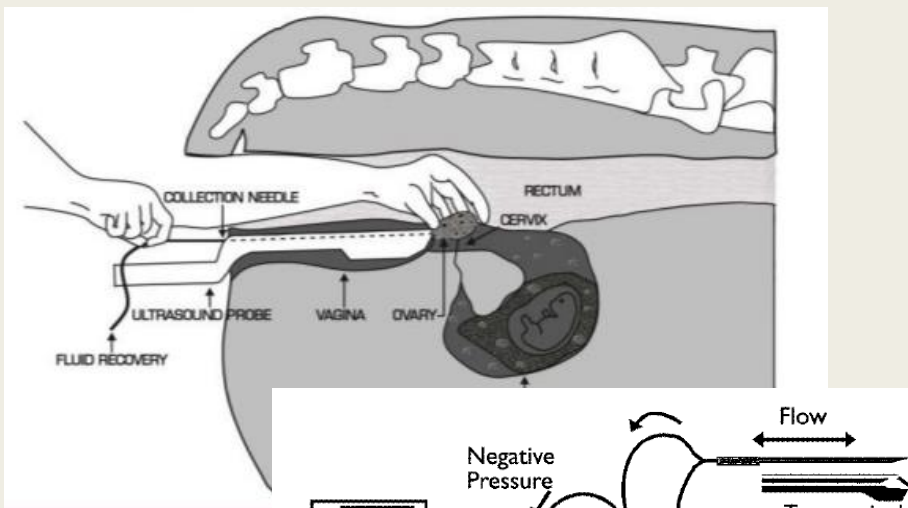


- zdravotní stav
- věk
- velikost
- temperament
- reprodukční stav (jalovice, kráva po porodu, březí, acyklická,..)
- reprodukční výkonnost (zabřezávání, porody)

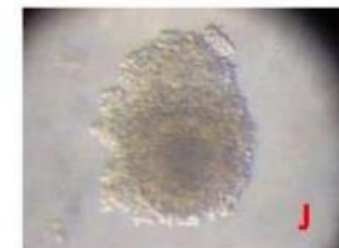


Ovum Pick Up

- Ultrazvukový přístroj
- Konvexní sonda
- Aspirační aparatura
- Vakuová pumpa



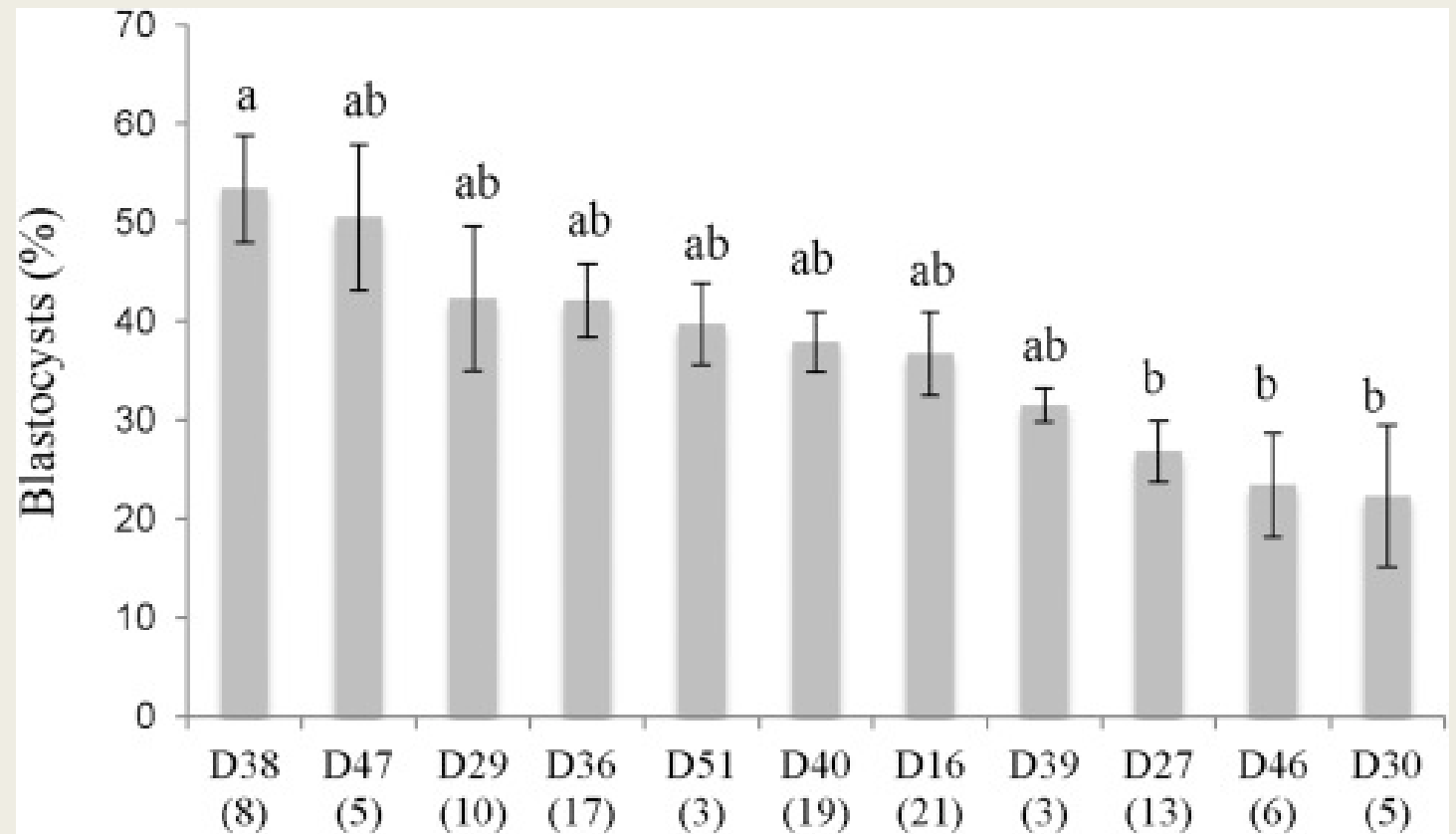
OPU procedure





Na dárkyni záleží...

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



Kdy se dají získávat oocyty?

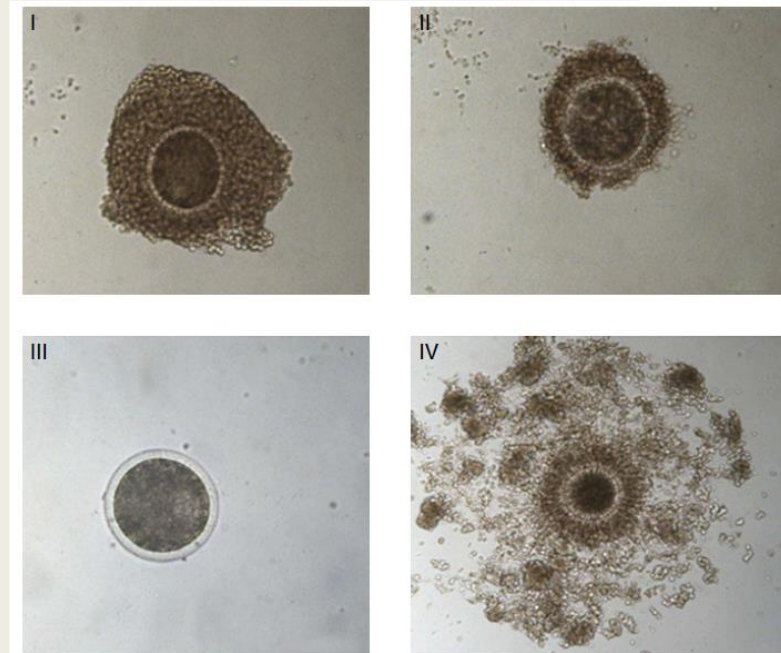
- Jalovice (lepší v pubertě – přirozená hormonální stimulace oocytů)
- Krávy: anestrické, acyklické, cyklující, březí (1. trimestr)

- 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

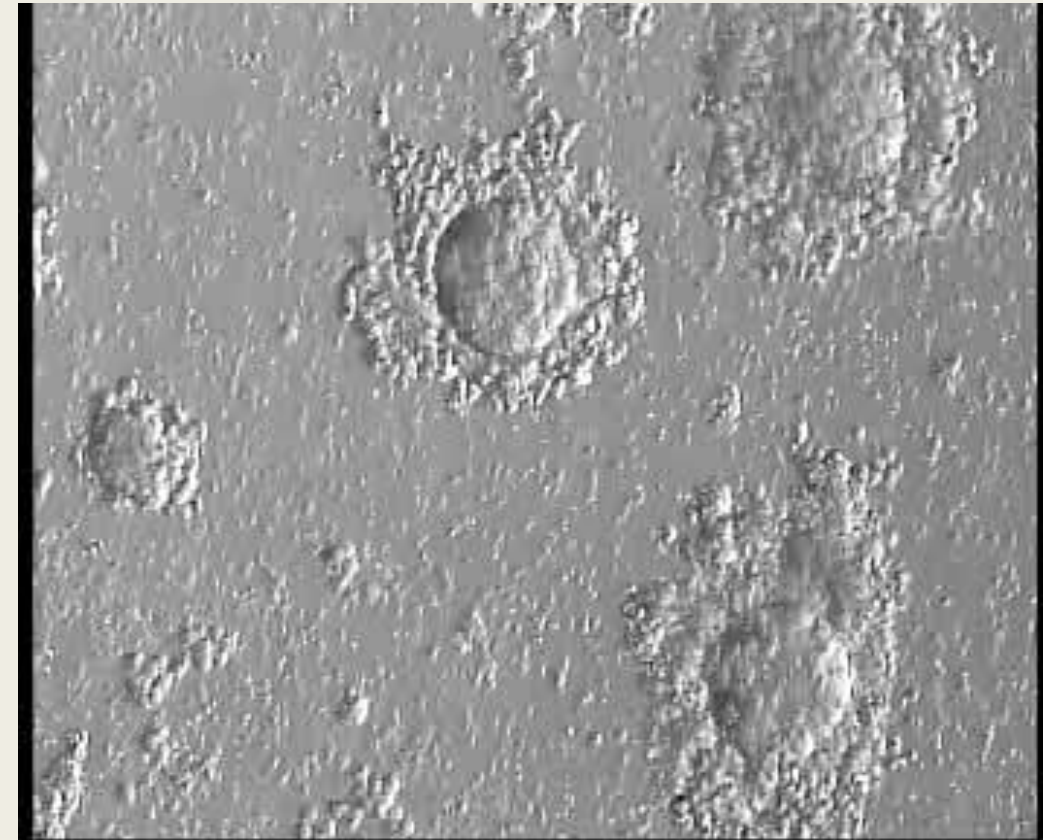
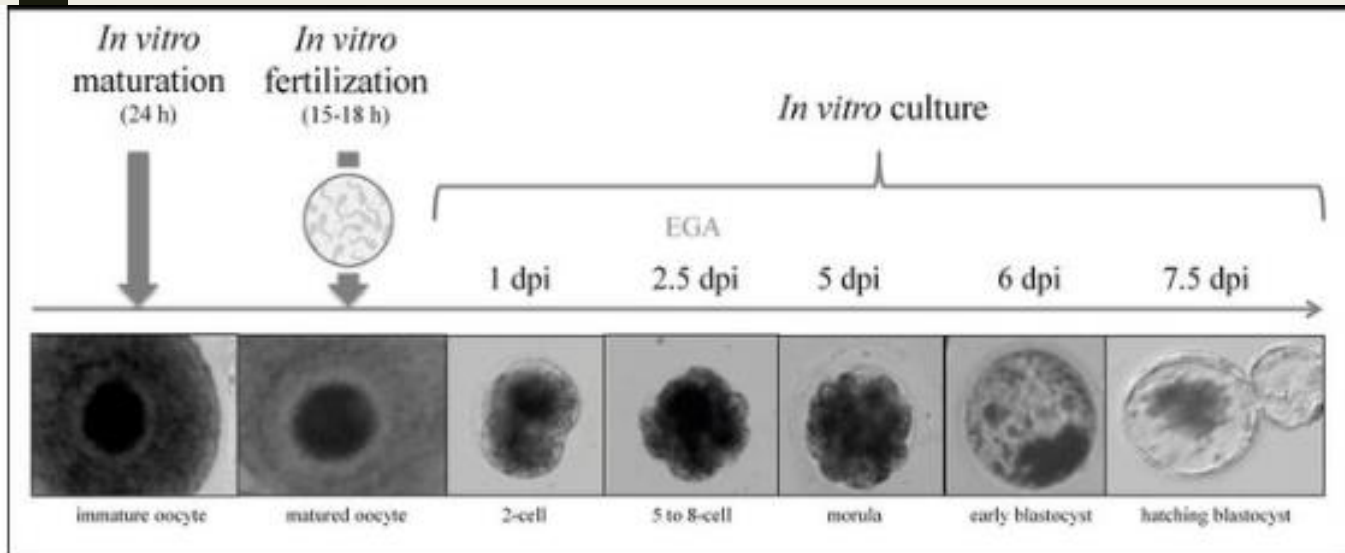
Co se děje s oocyty v laboratoři

- aspirované oocyty „nezralé“
- nutno „dozrát“ 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 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 37 °C do CO₂
- Kultivace embryí
 - 7 dní, 37 °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 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.

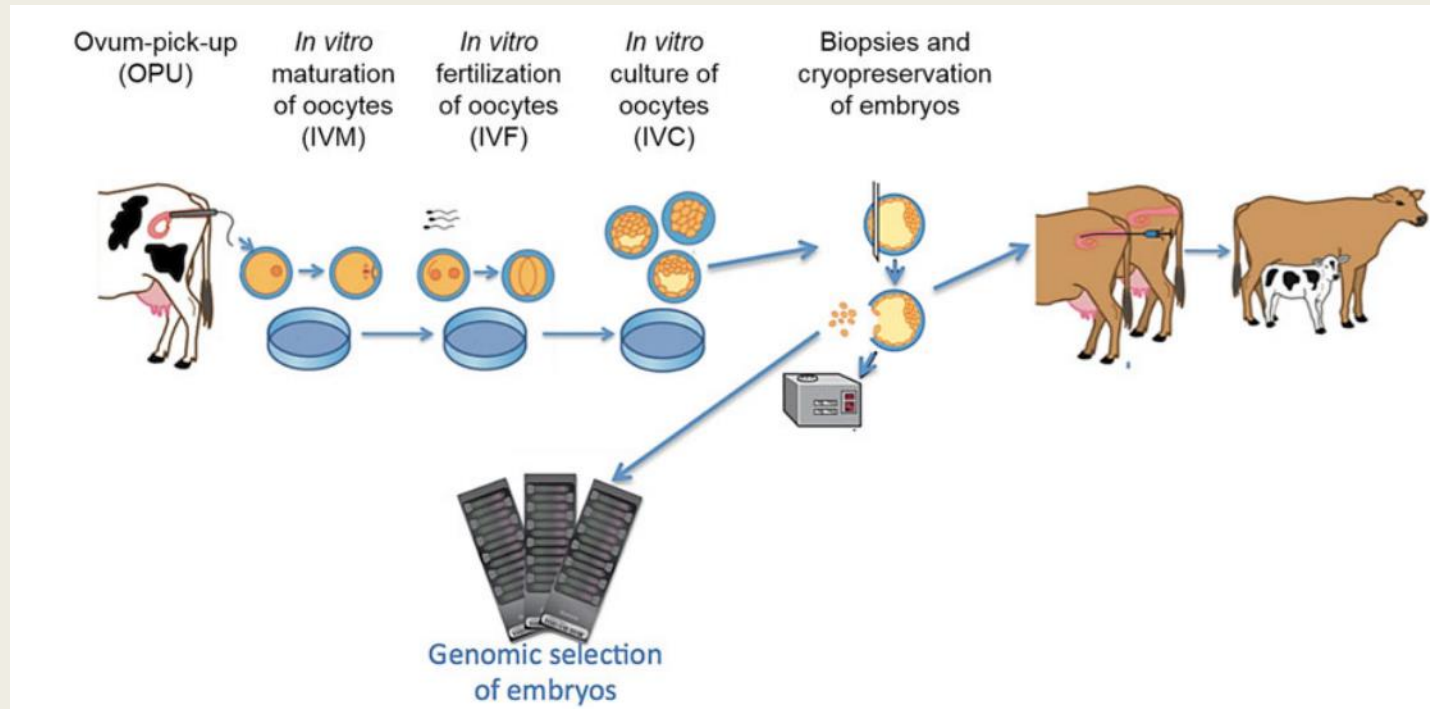
| Treatment | Recipients n | Pregnancy d 35 | | Pregnancy d 60 | | Pregnancy d 90 | |
|------------------|-----------------|-------------------|------|-------------------|------|-------------------|------|
| | | n | % | n | % | n | % |
| Fresh ET | 109 | 45 | 41.3 | 41 | 37.6 | 41 | 37.6 |
| Vitrification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

Liší se in vitro a in vivo embrya?

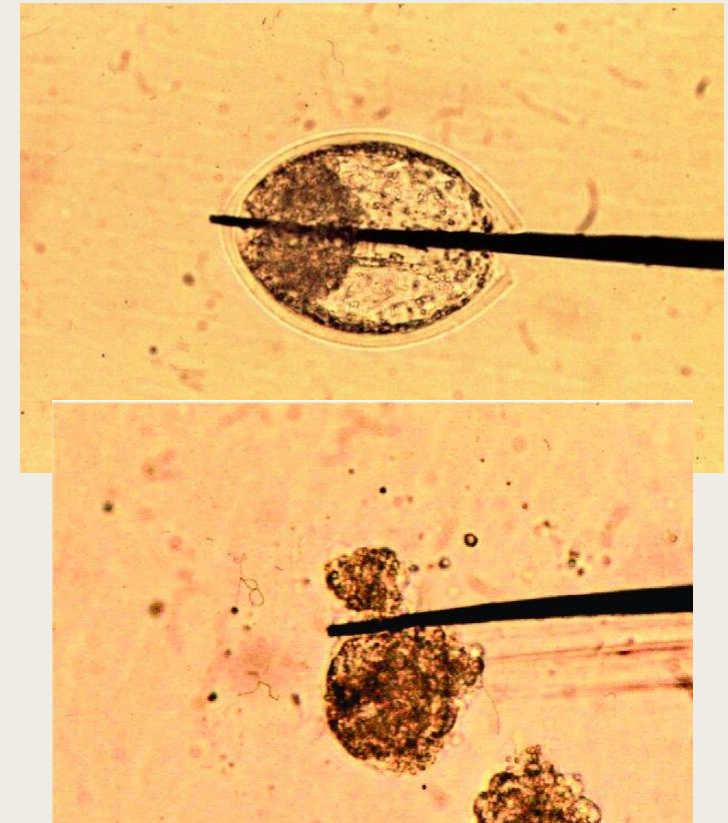
- ANO
 - *Exprese genů, abnormality chromozomů, přežitelnost mražení, ultrastrukturální změny, metabolismus embryí, morfologie*
- V zásadě je na vině rozdíl mezi inkubačními podmínkami
 - *Dynamický vývoj ve vejcovodu vs. Statické podmínky v inkubátoru*
- Z toho důvodu se věnuje optimalizaci inkubačních podmínek velké úsilí

Genotypizace IVP embryí...budoucnost!

- 30-60% březost
– *DT po kryo*

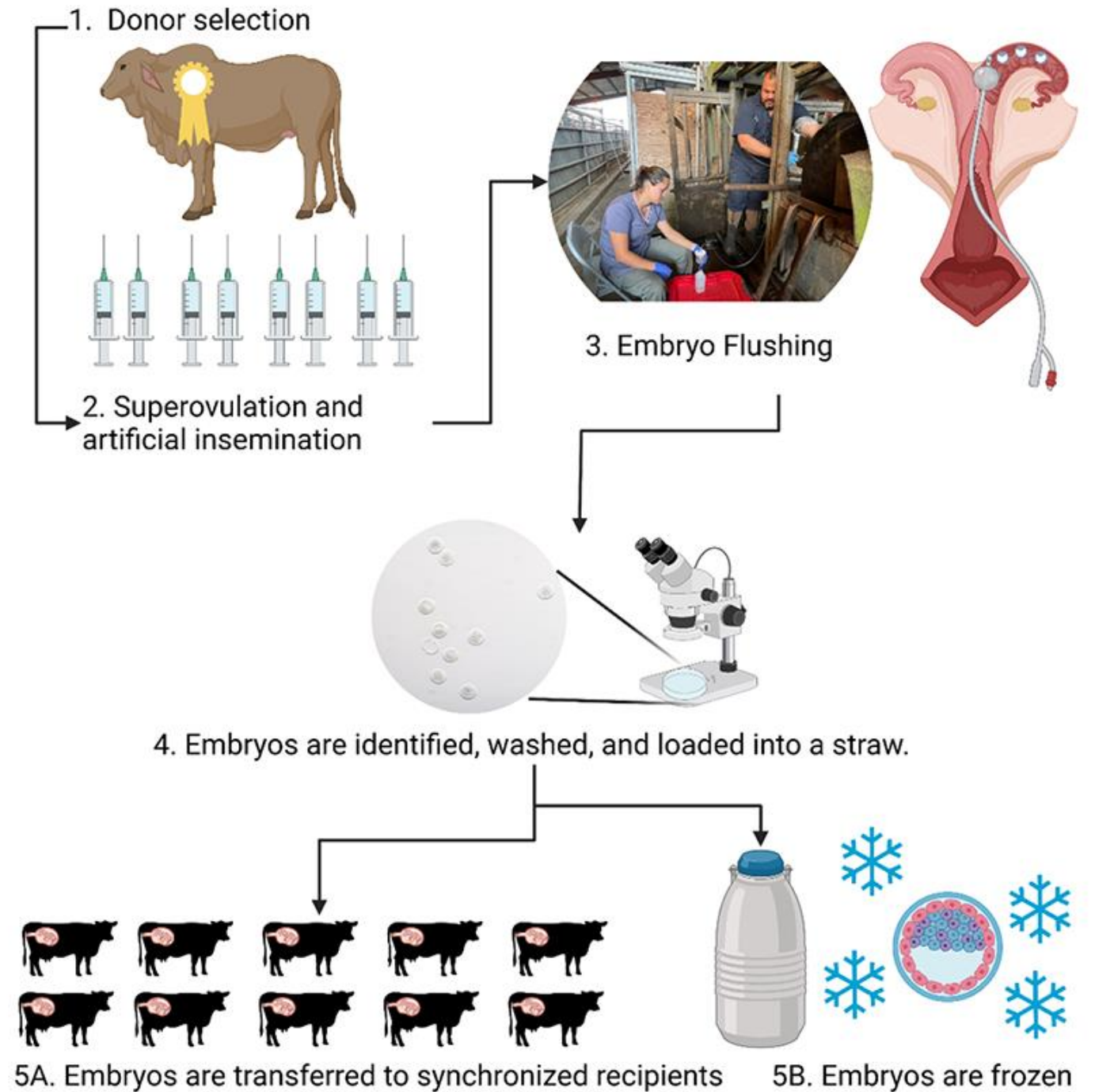


- Biopsie mikronožem – nejčastěji používaná v praxi
- Biopsie aspirací
- Aspirace jehlou



Rekapitulace...

je to
jednodušší než
se zdá



Nebojte se embryotransferu...není složitý

CO MUSÍTE UDĚLAT VY

- Vybrat dárkyni
- Případně vybrat příjemkyně
- Zavolat nám

776 210 380



603 154 374



CO UDĚLÁME MY

- Připravíme schéma embryotransferu
- Provedeme
 - *Výplach embryí*
 - *Hodnocení embryí*
 - *Přenos embryí*
 - *Kryokonzervace embryí*
 - *Uchování embryí*
- Komunikujeme s ČMSCH
 - *protokoly*
- Připravíme vše na mezinárodní prodej

Děkujeme za pozornost!

FarmVet.cz



STŘEDNÍ ŠKOLA
ZEMĚDĚLSKÁ A VETERINÁRNÍ
LANŠKROUN

Embryo  Lab