

In Vitro Produkce Embryí

Klíčová metoda ve šlechtění skotu

Úvod

In vitro produkce embryí (IVP) je celosvětově využívaná moderní biotechnologická metoda v chovech skotu. Pro chovatele nabízí několik klíčových výhod. Jednou z největších je zvýšení efektivity reprodukce a šlechtění. V tradičním embryotransferu, kdy se embrya získávají „přirozeně“, se zpravidla daří získat pouze několik desítek embryí na jednu dárkyni za její život v chovu. Naopak in vitro produkce embryí umožňuje získat mnohem větší počet embryí, až stovky, z jedné dárkyně, což zvyšuje šance na úspěšný transfer embryí a počet nově narozených telat. Proč lze získat mnohem více embryí od dárkyně pomocí in vitro metody? Jednoduše proto, že vajíčka lze získávat od jalovic od cca 11 měsíců věku, od časně oteletých krav (cca od 20. dne), od acyklických a anestrických plemenic a také od březích plemenic v průběhu prvního trimestru březosti. Navíc lze získat vajíčka z vaječníků od poražených zvířat. Tento moderní biotechnologický přístup také rozšiřuje genetickou selekci, což je klíčový parametr pro zlepšení vlastností stáda, jako je produkce mléka, odolnost vůči nemocem, dlouhověkost a další.

Současný stav

Získávání embryí klasickým postupem výplachy dělohy je celosvětově komerčně využívaná metoda již několik dekád. Oproti tomu u in vitro embryí můžeme o komerčním využití mluvit zhruba od roku 2000. I přes zásadní rozdíly v pracovních postupech, potřebném vybavení, laboratorním zázemí, časové náročnosti procesu a množství potřebných kvalifikovaných pracovníků předstihla in vitro produkce embryí v roce 2016 celosvětovou produkci embryí klasickým výplachem. V tabulce jsou uvedena souhrnná data za rok 2022. Za povšimnutí stojí fakt, že všechny sledované regiony (kromě Evropy) produkují mnohem více embryí in vitro (naprostými lídry jsou Severní a Jižní Amerika) a trend v této oblasti je stále vzrůstající (naposledy oproti roku 2021 je to +6,3 %).

Souhrnná data o počtu embryí získaných z výplachů dělohy (IVDE) a in vitro produkce (IVPE) z IETS (International Embryo Technology Society) za rok 2022

Region	IVDE	IVPE
Afrika	2027	7377
Asie	1764	14733
Evropa	137036	43749
Sev. Amerika	204682	842064
Oceánie	12455	20633
Již. Amerika	36545	688415
Celkově 2022	394509	1616971
Změna oproti 2021	+2,1	+6,3


Jak vznikají embrya v laboratoři?

Celý proces můžeme rozdělit na několik etap.

1. výběr a příprava dárkyně vajíček
2. odsávání vajíček (Ovum-pick up) a jejich zhodnocení
3. in vitro dozrání a oplození vajíček a kultivace embryí
4. kryokonzervace nebo přenos embryí (s tím pak souvisí příprava příjemkyně)

1. Výběr a příprava dárkyně vajíček

Výběr vhodné dárkyně vajíček je klíčový krok v procesu in vitro produkce embryí. Ne každá plemnice je totiž vhodnou dárkyní (ale to platí i u klasického embryotransferu). V rámci výtěžnosti vajíček hraje důležitou roli například plemeno, u masných zvířat povětšinou získáme více vajíček. Zdraví zvířete



Blastocysty (pět velkých kulovitých struktur) vzniklé po sedmi denní kultivaci v in vitro podmínkách (menší tmavé struktury jsou embrya zastavená ve vývoji)

ovlivňuje celou řadu procesů, mezi které se samozřejmě řadí i reprodukce tedy i produkce kvalitních vajíček. S ohledem na věk můžeme říct, že u jalovic je větší pravděpodobnost odsátí kvalitních vajíček (za to menšího počtu), ale například u starších krav, které měly telata, můžeme očekávat stejné nebo i lepší výsledky než u jalovic. Pokud uvažujeme nad tím, že vysoká mléčná produkce negativně ovlivňuje počet získaných vajíček, pak tomu tak úplně není. Pokud je totiž kráva vysokoprodukční (ale zároveň zdravá!) bývá to bezproblémová dárkyně.

V rámci přípravy dárkyně vajíček máme dvě možnosti. Buď se využívají reprodukční hormony nebo ne. S tím souvisí frekvence aspirací vajíček. Pokud se nepoužívají hormony, lze vajíčka odsávat 2x týdně. Pokud se využije hormonální stimulace, pak je to povětšinou jednou za 14 dní. Existuje několik různých hormonálních protokolů, proto je možné upravit aspirační schéma na základě individuálních potřeb každého chovatele.

2. Proces ovum-pick up (OPU)

Vajíčka se získávají transvaginální řízenou ultrazvukovou aspirací. V překladu to znamená, že se do pochvy zavede sonda ultrazvuku s aspiračním kanálem a na monitoru ultrazvuku se pak sleduje napichování folikulů (bublínka na vaječniku, ve které je vajíčko) a nasávání tekutiny s vajíčkem. Aspirát putuje do sběrací nádoby díky podtlaku, který vytvoří speciální pumpa. Důležité je v tomto případě maximálně dodržovat zásady čistoty a sterility, aby se předešlo komplikacím při laboratorní manipulaci (degradace vajíček) anebo infekcím.



Plemence musí být při odběru umístěna do fixační klece a celý proces aspirace vajčček se kontroluje přes monitor ultrasonografu

Teplota prostředí je naprosto zásadní faktor, který ovlivňuje životaschopnost získaných vajčček. Jsou totiž velmi teplotně sensitivní, a proto by měla být teplota okolí při aspiracích udržována minimálně na 15 °C.

Počet získaných vajčček se většinou pohybuje od cca 4 do cca 30. Záleží například na přípravě dárkyně a momentálním zdravotním a reprodukčním stavu. Ne každé získané vajččko je ale natolik kvalitní, aby mělo maximální předpoklad, že se oplodní a vyvine se v embryo. Proto se ihned po aspiraci hodnotí a do laboratoře putují pouze ty nejlepší (kvalita 1 nebo 2) a těch je zhruba 30-40 % ze všech získaných oocytů.

3. Laboratorní práce – IVM, IVF, IVC

Odsátá vajččka nejsou schopná oplození spermii, proto je nutné je nechat ve speciálních inkubátorech s řízenou teplotou a atmosférou dozrát (in vitro maturace – IVM). Zhruba za 24 hodin následuje krok, kdy se ke zralým, oplozením schopným vajččkům přidají spermie (in vitro fertilizace – IVF). Toto je další klíčový krok. To, že po použití konkrétních inseminačních dávek plemence v chovu březnou ještě vůbec neznamená, že je toto sperma vhodné k oplození. Z celé inseminační dávky se totiž složitým promýváním a gradientovou selekcí vybírají ty nejlepší spermie, které přežijí koupel ve speciálních médiích, rozvine se u nich kapacitace a akrozomální reakce a tím pádem jsou schopné proniknout do vajččka a oplodnit ho. Z vlastní zkušenosti mohu říct, že velmi často dostaneme od chovatelů sperma, které nelze pro IVF použít. Především se jedná o sexované inseminační dávky. Proto se obecně s vajččky přivážejí i dvě varianty „býka“. Pokud ale proběhne při IVF vše, jak má, za dalších cca 24 hodin se vajččka očistí a vloží do inkubátoru s jinou řízenou atmosférou a nechávají

se kultivovat (in vitro kultivace – IVC) po dobu dalších sedmi dní. Během této doby se embrya vyvíjejí v prostředí, které je přizpůsobeno specifickým potřebám vyvíjejícího se zárodku. Zjednodušeně se dá říct, že se snažíme v každém kroku laboratorní práce maximálně imitovat fyziologické podmínky, které jsou v těle samice a používáme k tomu sterilní materiál, chemicky definovaná média a využíváme speciální inkubátory s řízenou atmosférou a teplotou.

Jak je asi zřejmé, počet získaných embryí z jednoho OPU ovlivňuje mnoho faktorů. Jedním z nejdůležitějších je samozřejmě počet kvalitních vajčček, které se dále zpracovávají v laboratoři. Obecně se uvádí, že z diskutovaných kvalitních oocytů (kvalita 1 nebo 2) se získává 50 % embryí. Pokud tedy začnu s 10 kvalitními oocyty, je za předpokladu dodržení veškerých postupů a použití kvalitního spermatu možné předpokládat zisk až 5 embryí. Jedna z velkých a zajetých laboratoří v USA (RuAnn Genetics) publikovala data ze 3233 aspirací, kdy získali průměrně 15,6 vajčček, z toho ale bylo pouze 34 % kvalita 1 nebo 2 a po laboratorním zpracování získali průměrně 3,6 embrya na dárkyni.

4. Přenos čerstvých embryí nebo kryokonzervace

Embrya vzniklá v laboratoři jsou mnohem „křehčí“ v porovnání s embryi získanými výplachem dělohy a musí se k nim také tak přistupovat. V praxi to znamená, že pokud se nachází farma blízko laboratoře, je možné je po krátký čas uchovat ve speciálním médiu a poté je přenést do příjemkyň. Výběru příjemkyň je nutné věnovat maximální pozornost, protože z celého postupu je to finální krok, a proto i velmi důležitý. Každá příjemkyně by měla mít odsledovanou pravidelnost říjových cyklů, musí být zdravá a stáří embrya musí odpovídat dnu říjového cyklu po ovulaci. Samotný postup přenosu je pak stejný jako u klasického embryotransferu. V případě, že nemá chovatel k dispo-

zici dostatečné množství příjemkyň, dochází ke kryokonzervaci embrya. Zde se opět trochu liší postup od kryokonzervace „vypláchnutých“ embryí. Nevyužívá se pomalého mražení, protože v tomto případě je vysoké riziko tvorby ledových krystalů uvnitř embrya, které by ho mohly výrazně poškodit (pamatujme, laboratorní embrya jsou křehká). Uplatňuje se zde tzv. vitrifikace, což je naopak ultrarychlé mražení, kdy uvnitř embrya vzniká sklu podobná struktura, čímž se minimalizuje vznik ledových krystalů. Této sklu podobné struktury se docílí tak, že laboratorní embrya po určitý čas setrvávají ve třech roztocích o různé koncentraci kryoprotektantů a poté se umístí přímo do tekutého dusíku. Vitrifikovaná embrya se nerozmrazují jako klasická, ale ve třech krocích se musí zbavit vysokých koncentrací kryoprotektantu, který je pro ně letální. I když by se mohlo zdát že „vhození“ pejetý s embryi do dusíku musí být horší variantou, opak je pravdou. U laboratorních embryí bylo prokázáno, že po tomto postupu příjemkyně zabřezávají s vyšší pravděpodobností.

Závěr

In vitro produkce embryí přináší mnoho výhod jak pro chov dojeného tak masného skotu. Mezi nejvýznamnější patří zvýšená efektivita reprodukce a schopnost rychlého šlechtění. Chovatelé skotu mohou maximalizovat genotypovou rozmanitost a využít geneticky hodnotné rodiče, což významně zlepšuje například produktivitu mléka a zdravotní stav zvířat. Dále, díky většímu množství embryí, které mohou být získány z jedné dárkyně, dochází ke snížení ekonomických nákladů na reprodukční postupy. V konečném důsledku in vitro produkce embryí představuje inovativní a efektivní přístup k modernímu chovu skotu, který pomáhá optimalizovat celkovou produktivitu a udržitelnost odvětví.

*doc. Ing. Jiří Šichtař, Ph.D.
EmbryoLab s.r.o.*



Provizorní laboratoř v prostorách stájí. Vybavení je podobné jako u klasického ET, ovšem velmi důležité je udržovat média a posléze i vajččka ve stanovené teplotě.