

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
VETERINARSKI FAKULTET



PROIZVODNJA GOVEĐIH ZAMETAKA *IN VITRO*: TRENUTNO STANJE I MOGUĆNOSTI PRIMJENE U HRVATSKOM GOVEDARSTVU

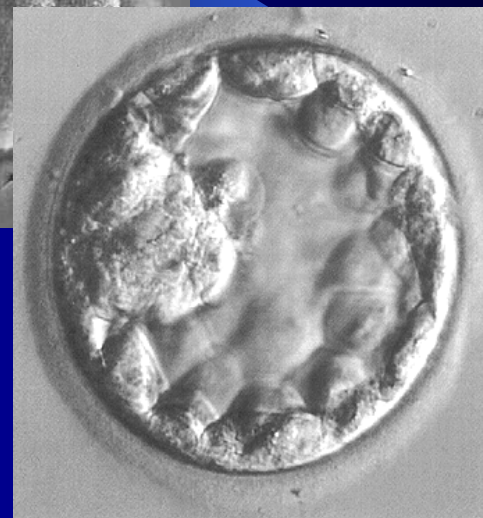
Iva Getz¹, Marijan Cergolj¹, Zdenko Makek¹,
Martina Lojkić¹, Marko Samardžija¹, Mario Matković²

¹ *Laboratorij za asistiranu reprodukciju Klinike za porodništvo i reprodukciju,
Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu*

² *Centar za reprodukciju u stočarstvu Hrvatske d.o.o., Planinska 2b,
10000 Zagreb, Croatia*

*IV Srednjeeuropski Bujatrički Kongres – Asistirana Reprodukcijska u Goveda
(Međunarodni Znanstveno-Stručni Kongres), 23-27 travnja 2003.*

Laboratorij za asistiranu reprodukciju



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
VETERINARSKI FAKULTET U ZAGREBU



- Projekt MZT "*In vitro* oplodnja u goveda" (1997.-2002.), glavnog istraživača prof. dr. sc. Zdenka Makeka
- travanj 2001. – prvo IVP tele u Hrvatskoj
- Projekt MZT "*In vitro* uzgoj i mikromanipulacija goveđim zamecima" (2002.-)



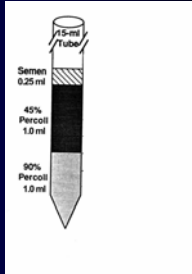
Projekt “*In vitro* oplodnja u goveda” (1997.- 2002.)

Istraživali smo:

- Metode pripreme bičjeg sjemena za oplodnju *in vitro*;
- Metode uzgoja *in vitro* goveđih zametaka;
- Metodu transvaginalne ultrazvučne aspiracije jajnih stanica krava (OPU = ovum pick-up);
- Metode ocjene kvalitete jajne stanice i kinetika razvoja *in vitro* uzgojenih goveđih zametaka:

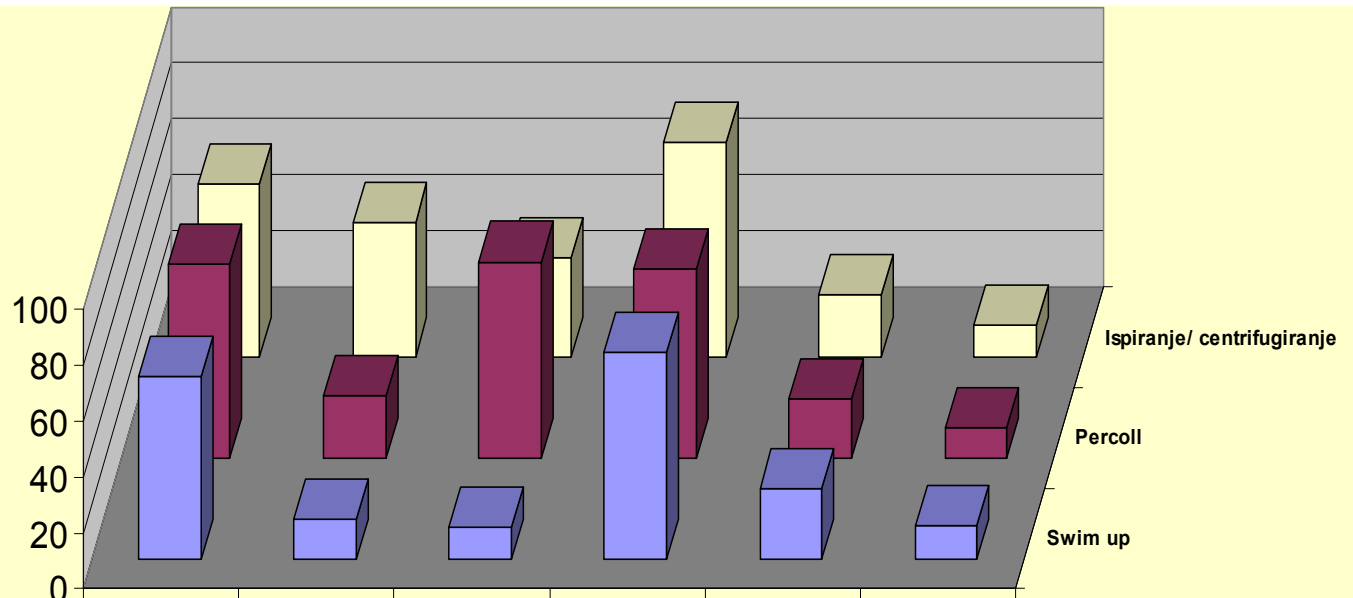
Metode pripreme sjemena za oplodnju *in vitro*

- Centrifugiranje na gradijentu Percolla (Parrish i sur., 1995.)
- Selekcija pokretljivih spermija aktivnom migracijom u mediju - Swim-up postupak (Parrish i sur., 1984.)
- Ispiranje i Centrifugiranje u sp-TALP mediju bez kalcija (Shamsuddin i sur., 1993.)



Koinkubacija jajnih stanica i spermija: 24 do 48 sati ovisno o metodi uzgoja na 39°C i 5% CO₂

Usporedba tri metode pripreme sperme za oplodnju i uzgoj in vitro:



	Pokretljivost (%)	Neoštećen akrosom	Koncentracija 10 ⁶ /ml	Brazdanih j.s. u IVF	M + BI (7. dan)	hBI (10. dan)
Swim up	65	14	11,0	73,6	24,8	11,7
Percoll	69	22,5	70,0	67,5	20,9	10,8
Ispiranje/ centrifugiranje	62	48	35,4	76,6	22,4	11,8

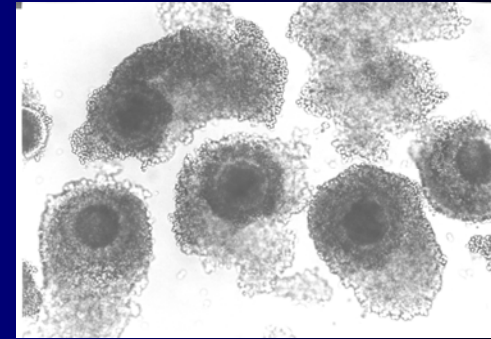
Uzgoj goveđih zametaka in vitro: usporedba rezultata uzgoja u kokulturi sa stanicama granuloze i uzgoja u definiranom mediju

CILJ ISTRAŽIVANJA:

Usporedba 2 metode uzgoja in vitro (IVC) oplodjenih jajčanih stanica:

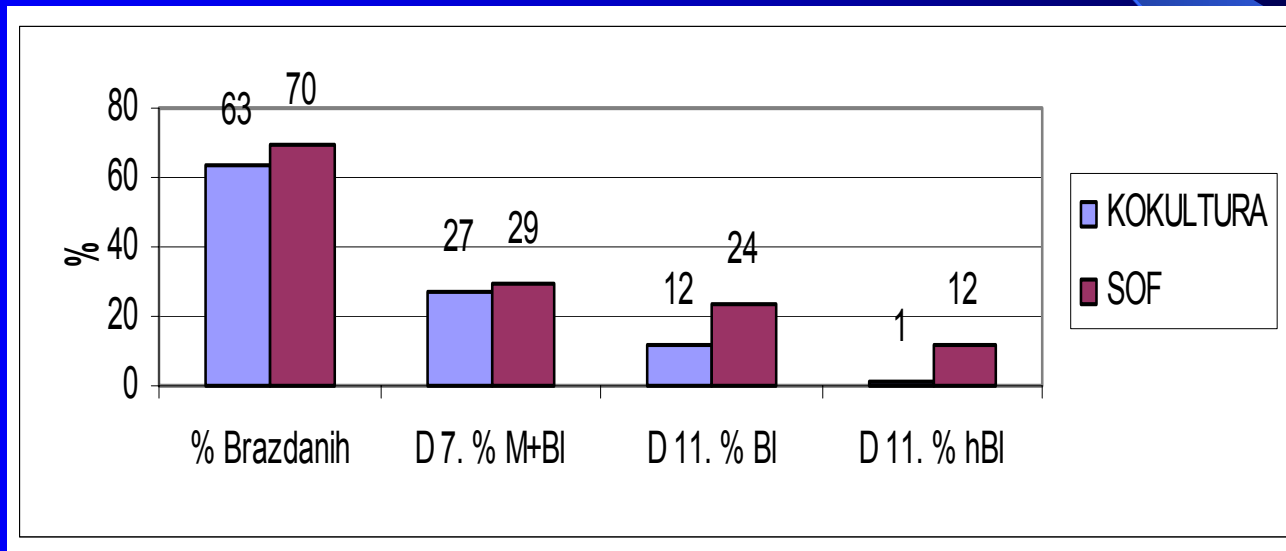
1. Kokulture sa stanicama granuloze (KOKULTURA), koja je bila naša standardna metoda, i
2. Uzgoja u definiranom mediju SOFaaBSA (SOF) - omogućuje bolju sanitarnu kontrolu, kao i bolju kontrolu uvjeta uzgoja.

- **IVM:** TCM199 medij s 10% FCS, gonadotropina, estradiola i cisteamina. Inkubacija: 24^h na 39°C i 5% CO₂

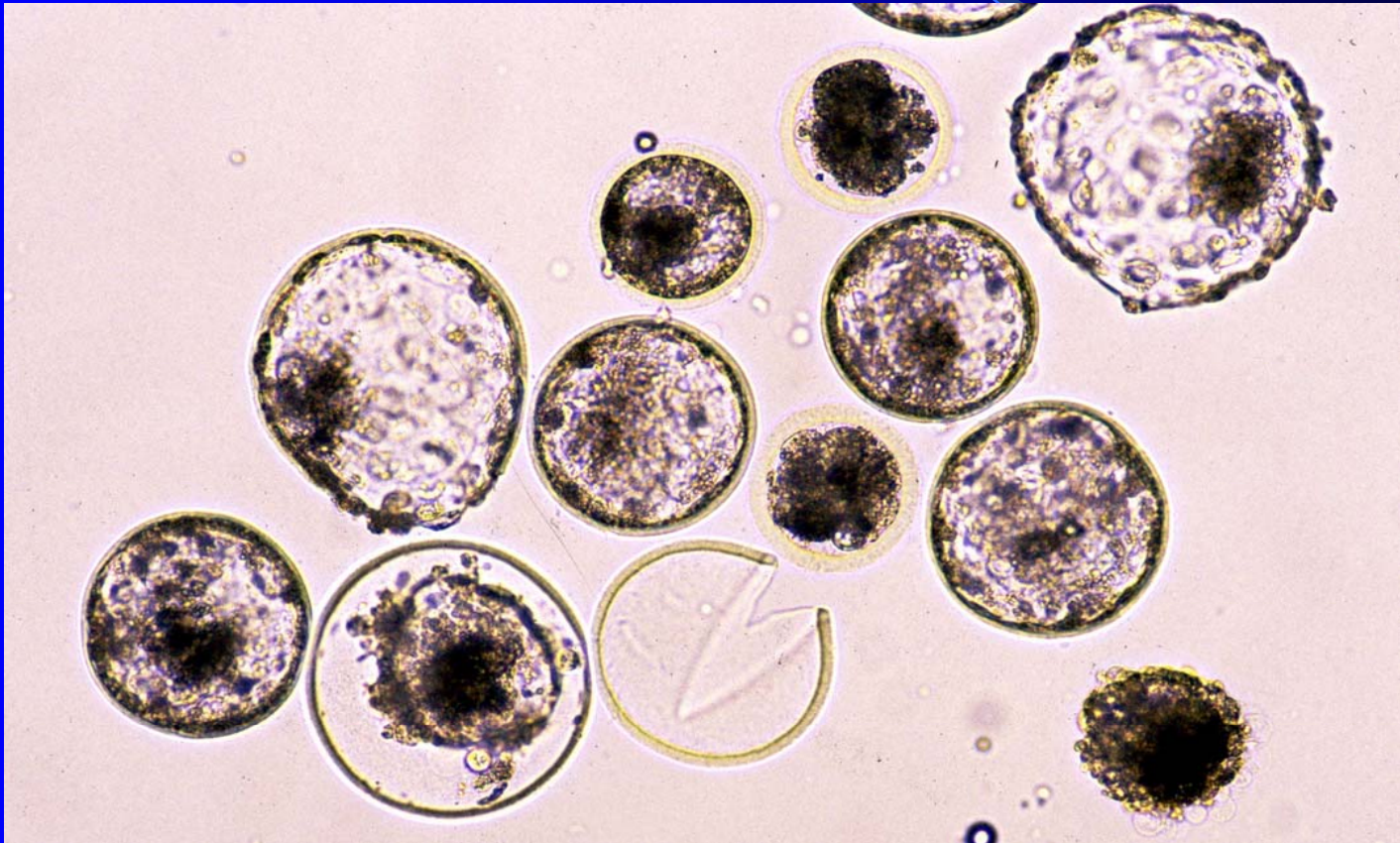


- **IVF:** Duboko zamrznuta/otopljena sperma bika pripravljena na gradijentu Percolla. Konačna koncentracija za IVF: 10⁶ spermija/ml
- **Uzgoj u ko-kulturi sa stanicama granuloze:** Ko-kultura pripravljena iz aspirata antralnih folikula. Koncentracija: 3 x 10⁶ stanica/ml. Uzgoj u mikrokapljicama s Medijem za uzgoj granuloze (MUG) - TCM199 s 10% FTS.
- **Uzgoj u definiranom SOFaaBSA mediju.** Inkubacija: 39°C u atmosferi s 5% CO₂, 7% O₂ i 88% N₂

Usporedba uzgoja in vitro govedih zametaka u kokulturi sa stanicama granuloze i uzgoja u definiranom mediju SOFaaBSA

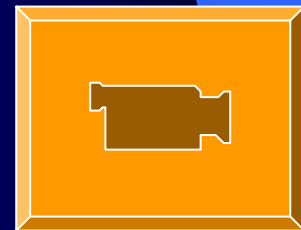


Govedi zameci uzgojeni in vitro (10. dan)
u definiranom SOFaaBSA mediju



Transvaginalna ultrazvučna aspiracija jajnih stanica krava (OPU = ovum pick-up)

- A. OPU krava u ciklusu (sinkronizirane s $\text{PGF}_2\alpha$): OPU dva puta tjedno tijekom mjesec dana (8 punkcija po kravi), počevši od 3. ili 4. dana ciklusa;
- B. OPU krava stimuliranih s FSH/LH (Stimufol[®], Merial, France) 2 uzastopna dana (ukupno 4 ml u padajućim dozama: 1,2; 1,2; 0,8; 0,8 ml);
- C. OPU krava stimuliranih s 1500 i.j. PMGS (Folligon[®], Intervet) Transvaginalna ultrazvučna punkcija jajnika - 3. dan (B. i C.) Postupak stimulacije i punkcije jajnika ponovljen je tijekom tri uzastopna tjedna.



REZULTATI

OPU krava u ciklusu:

- Broj aspiriranih jajnih stanica po punkciji: od 1 do 6 (prosječno 2,8).

OPU nakon stimulacije jajnika s FSH/LH:

- Broj aspiriranih jajnih stanica kretao se od 1 do 9 (prosječno 4,2).

OPU nakon stimulacije jajnika s PMSG:

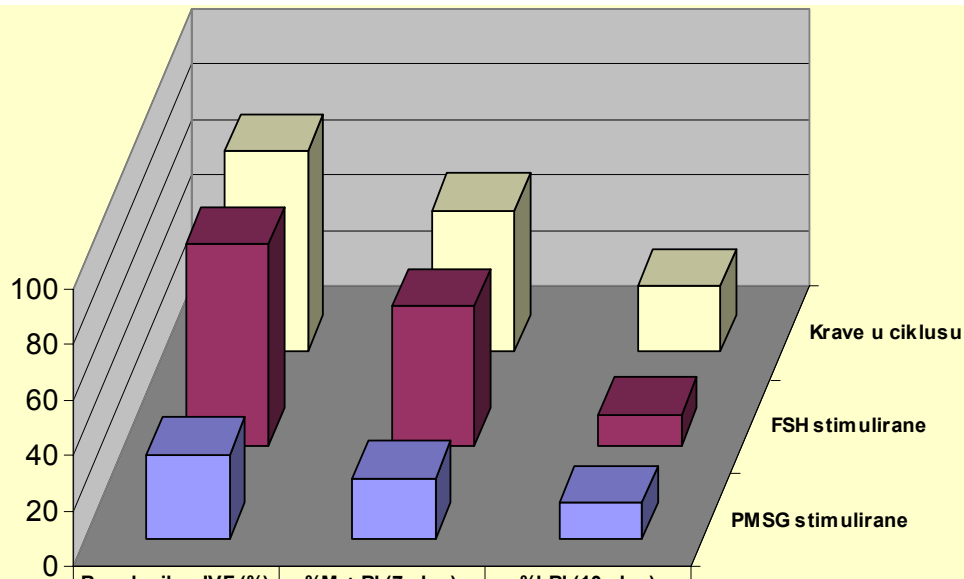
- Broj aspiriranih jajnih stanica kretao se od 0 do 8 (prosječno 3,8).
- kod jedne davateljice obostrano na jajnicima došlo je do pojave cista.



Ehogram 1:

Jajnici krave nakon
stimulacije s FSH/LH

Rezultati oplodnje i uzgoja in vitro jajnih stanica aspiriranih iz jajnika krava u ciklusu te stimuliranih s FSH/LH i PMSG.



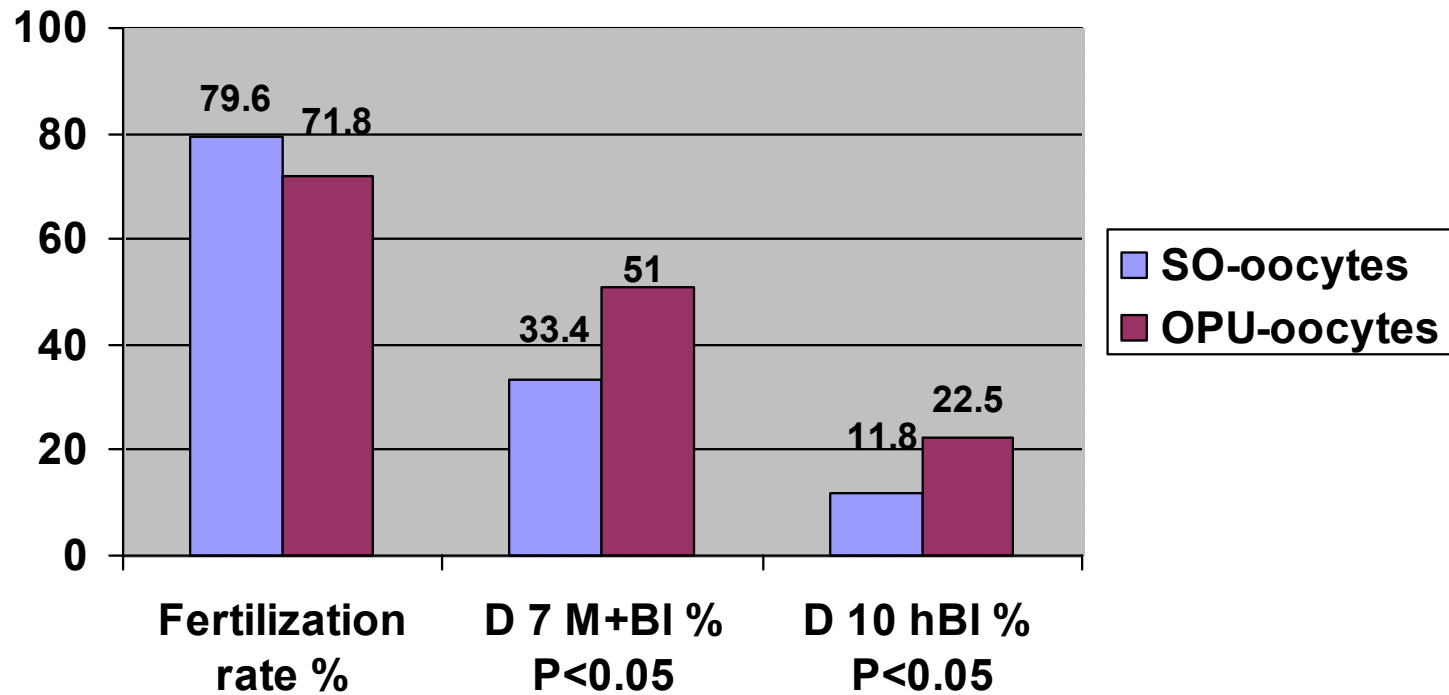
	Brazdanih u IVF (%)	%M + BI (7. dan)	%hBI (10. dan)
■ PMSG stimulirane	30,4	21,7	13,0
■ FSH stimulirane	72,2	50,0	11,1
□ Krave u ciklusu	71,9	50,6	23,6

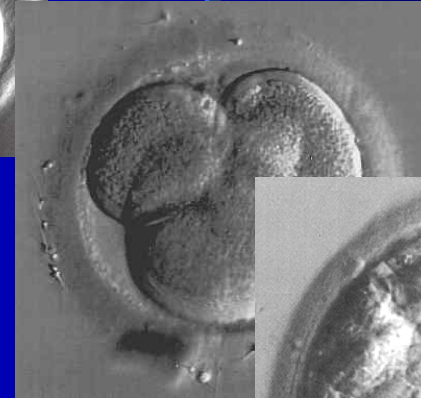
Mogućnosti primjene OPU tehnike:

- Alternativa klasičnom MOET-u (do 100 zametaka godišnje po davateljici)
- Više teladi od iste davateljice i različitih bikova (smanjivanje inbreedinga)
- Jajne stanice gravidnih junica i krava te krava u puerperiju
- Dobivanje potomstva od sekundarno jalovih, genetski vrijednih plotkinja
- Jajne stanice od ženske teladi prije puberteta



Picture 1: A comparison of developmental competence between SO- and OPU-derived oocytes





SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
VETERINARSKI FAKULTET U ZAGREBU

