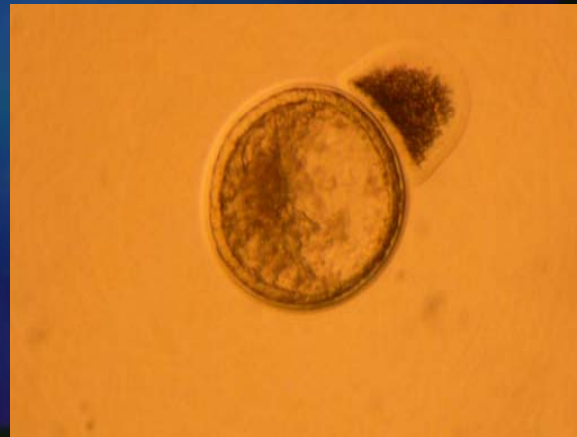


Postupci asistirane reprodukcije u kobilama

Zagreb,
12. studenog 2009.



Doc.dr. Juraj Grizelj
Veterinarski fakultet
Zagreb, Hrvatska



Pregled

- polučivanje ejakulata i izrada doza
- umjetno osjemenjivanje
- ispiranje davateljica
- sinkronizacija davateljica
- smrzavanje zametaka
- otapanje i transfer zametaka
- dijagnostika gravidnosti

Polučivanje ejakulata i izrada doza za UO

- polučivanje 3x/tjedno ili više (čak i svaki dan ako je nužno)
- Početak polučivanja: starost pastuha 4godine
- od 1 ejakulata – 15 do 40 doza, 15mL
- svaka doza 200 (400) milijuna spermija
- umjetne vagine, 42°C



Polučivanje ejakulata i izrada doza za UO



Polučivanje ejakulata i izrada doza za UO

- procijeđivanje
- određivanje koncentracije (spermija/mL)
- broj doza/ejakulatu
- razrjeđivač obrano ili polumastno mlijeko, 37°C
- UO: svježim, pohranjenim na +4°C (48h) ili smrznutim sjemenom





Umjetno osjemenjivanje

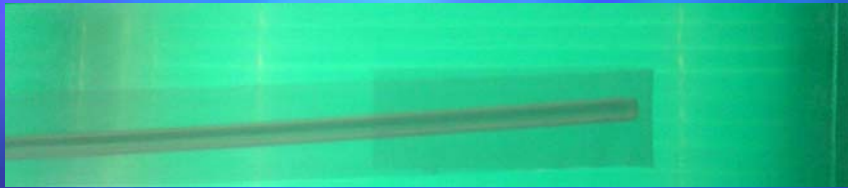
- Svakodnevno UZV praćenje rasta F u estrusu (3mm/dan!)
- BOLJE UO PRIJE OVULACIJE (0-24-48h)!!



Umjetno osjemenjivanje

- Osjemenjivanje svako drugi dan nakon $F \geq 35\text{mm}$ sve do ovulacije
- Kod smrznutog SVAKI DAN! + indukcija ovulacije (1500 i.j. hCG), imunizacija(!)
- Uspjeh UO: 50% sa svježim, nešto slabije sa smrznutim

Tehnika izvođenja



Kateteri za UO svježim i smrznutim/otopljenim sjemenom s sanitarnom košuljicom i mandrenom

EMBRIOTRANSFER



- Redovito ginekološki pregledavane (spolni ciklus, F/CL, uterus s cerviksom)
- U estrusu pregled svako 24h→indukcija ovulacije 15mg CEG i/v, ovulacija 36h
- Sutradan poslijepodne UO 400×10^6 sp./10mL
- utvrđivanje ovulacije dan iza UO i planiranje ispiranja davateljice 6d kasnije; sveukupna starost zametaka 6,75d

Ispiranje i transfer

Zašto ju ne pustimo na miru?

- ✦ Dobivanje ždrjebadi od starih, ali vrijednih **kobila DAVATELJICA** koje ne mogu iznijeti graviditet do kraja
- ✦ Dobivanje puno zametaka od jedne kobile u jednoj sezoni
- ✦ **Kobila DAVATELJICA** se može natjecati cijelu sezonu, a primateljica graviditet – surogat majčinstvo
- ✦ Uspjeh transfera u idealnim uvjetima i do 87%
- ✦ Ipak, postoje i neka pasminska i zakonska ograničenja!

Tehnika ispiranja maternice donorice

- KADA? 7.dana, 8.dana, 6. dana nakon ovulacije
- KAKO? 3x1L zagrijanog medija (Ringer Laktat)
- Uvođenje sonde za ispiranje u maternicu



Ispiranje maternice

- Ulijevanje medija u maternicu; rektalna masaža maternice; povrat medija iz maternice
- Filtracija ispirka

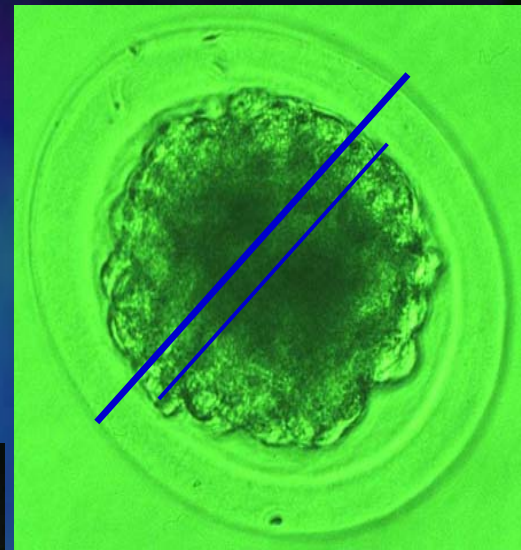


Tehnika ispiranja maternice



Pretraživanje ispirka

- ispirak u Petrijevoj posudi, lupa
- ispiranje i ocjena zametka

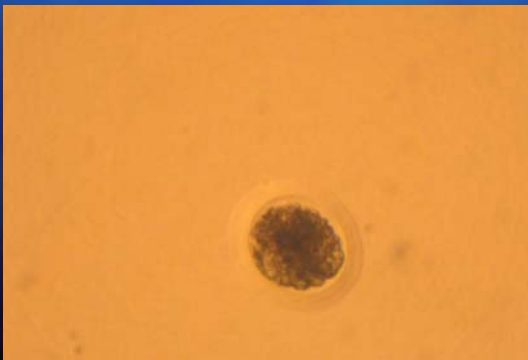


Kriteriji morfološke ocjene zametaka (Squires i Seidel, 1995)

- **ocjena 1:** idealan – okrugao, uniformne blastomere po veličini i boji, ovojnice glatke; $\geq 85\%$ stanica vitalno
- **ocjena 2:** veoma dobar - manji nedostatci; ekstrudirane blastomere, separacija trofoblasta; veličina, gustoća i boja stanica; $\geq 50\%$ stanica vitalno
- **ocjena 3:** jasni, ali neugrožavajući nedostatci, kolabirani blastocel, ekstruzija BM, oblik ovojnica
- **ocjena 4:** ozbiljni nedostatci; snažno kolabirani blastocel, snažna ekstruzija i dgn. stanica, ovojnice oštećene
- **ocjena 5:** mrtvi zametak

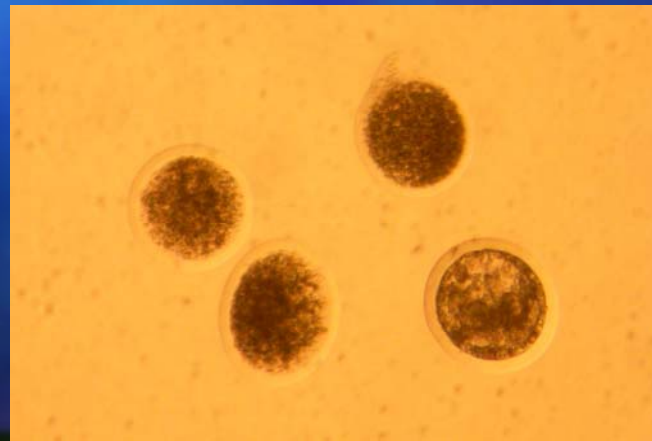
Morfologija konjskog zametka

- **Mlada morula:** segmentacije, nakupina 16-32 veće blastomere
- **Kompaktna morula:** 32-64 zbijene manje blastomere



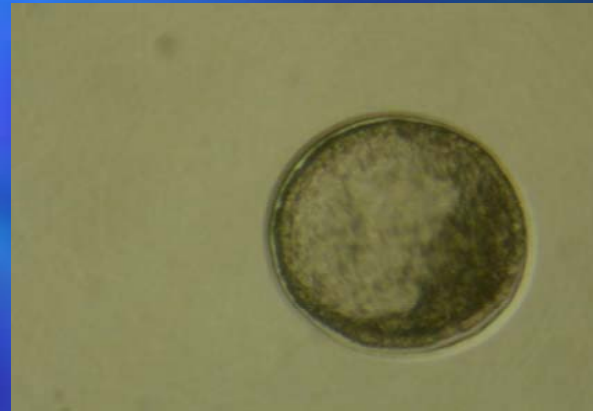
Morfologija konjskog zametka

- **Mlada blastocista:** diferencijacija stanica, **tvorba kapsule**, blastocel <50%



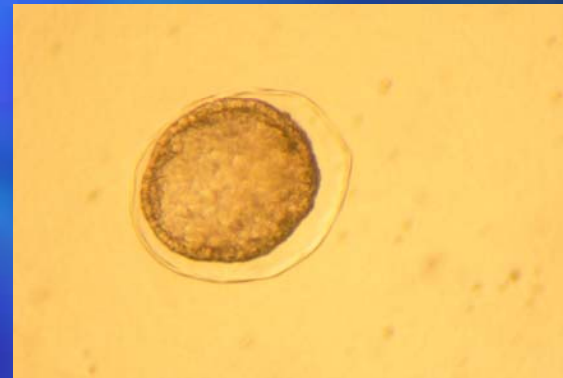
Morfologija konjskog zametka

- **Blastocista:** blastocel >50%, stanjena zona pellucida, deblja kapsula



Morfologija konjskog zametka

- **Ekspandirana blastocista:** vrlo tanka zona, ekspanzija blastocela



Morfologija konjskog zametka

- **Izvaljena (hatched) blastocista**, puca zona
- Dolazak zametka u maternicu 5-6d post ovulationem
- pokretljivost 6-16d
- fiksacija 16-35d
- implantacija

Veličina i razvojni stadij zametaka prilikom ispiranja

- Veličina zametaka 133-389 μ m, srednja vrijednost 210 μ m
- Squires i Seidel (1995) 6d stadij morule ili mlade blastociste
- Oguri i Tsutsumi (1972) te Betteridge (1989) 6 dana po ovulaciji utvrđuju veličinu zametaka od 150 μ m

Razvojni stadij	Σ
Morula	13 (10,3%)
Mlada blastocista	71 (56,3%)
Blastocista	35 (27,8%)
Ekspandirana blastocista	5 (4,0%)
Izvaljena blastocista	2 (1,6%)

Što sada sa
zametkom?????

Smrzavanje
6d star
zametak

Svježiji transfer
7d star zametak

✦ transcervikalni

✦ kirurški

✦ sinkronizacija i odabir
**PRIMATELJICE (RECIPIJEN-
TICE)**

✦ otapanje i transfer po potrebi
✦ sinkronizacija davateljice s
primateljicom nije potrebna



Svježi transfer

- Sinkronizacija: ako krdo konja – samo UZV praćenje i odabir
- Najbolja primateljica je ona koja ovulira 2dana iza davateljice (-1, +3d)



Odabir primateljice

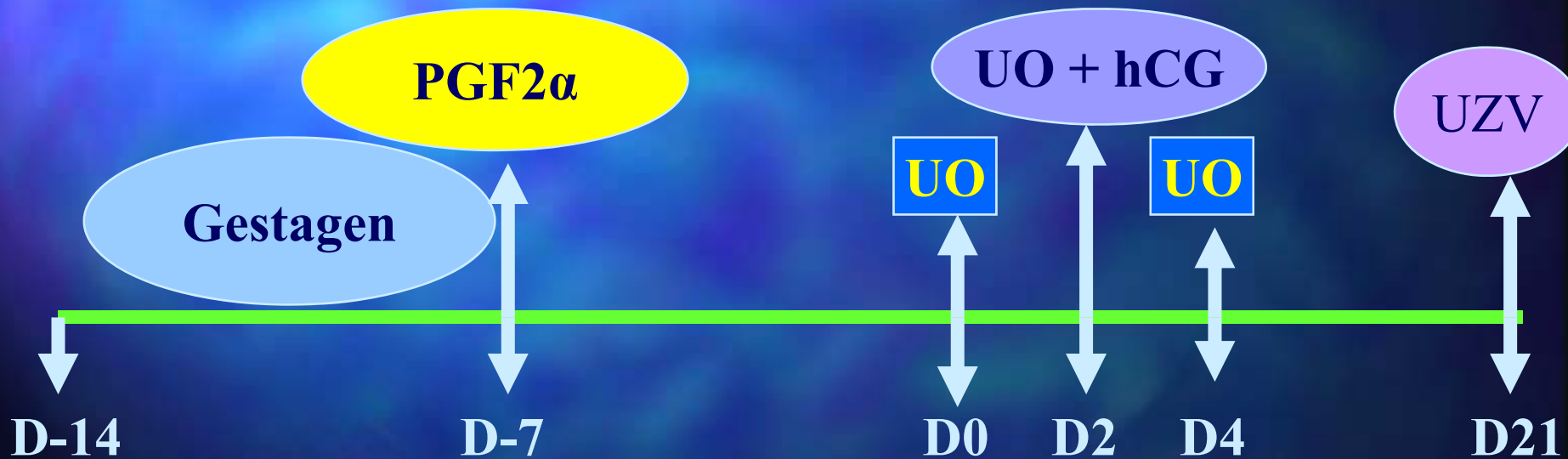
- tjelesni okvir, prethodno se ždrijebila
- gnkl. b.o. – posebno uterus i jajnici
- cerviks – čvrst, toničan, zatvoren
- maternica – obla, cjevasta, toničnam bez sadržaja i nabora



Transfer

- Ako imamo malo primateljica – hormonalna sinkronizacija
- Na 1 davateljicu minimalno 2-3 potencijalne primateljice koje tretiramo i izabiremo najbolju
- KAKO???

Uf, ovo je jako komplicirano???



Za primateljicu je protokol isti, samo ju NE OSJEMENJUJEMO, a ovulaciju induciramo kada utvrdimo da je davateljica ovulirala!

Transcervikalni transfer

- brz, jednostavan
- do 80% uspjeha



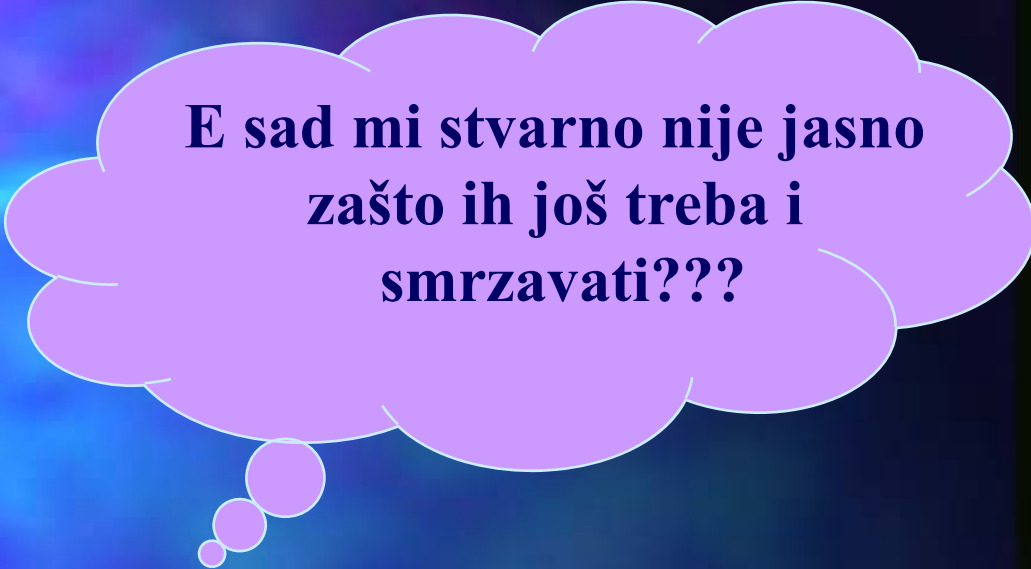
Kirurški transfer

- Paralumbalna jama
- 5.dan nakon ovulacije



Kirurški transfer





**E sad mi stvarno nije jasno
zašto ih još treba i
smrzavati???**

**Smrzavanje konjskih
zametaka (krioprezervacija)**

Zašto krio???

- zamjenjuje sinkronizaciju
- promet genski vrijednih zametaka
- banke zametaka vrijednih grla i ugroženih pasmina
- 2001.god. epidemija SIŠ u V.B. – pobijeno 4 000 000 grla
- **KRIO JE U KONJA JOŠ UVIJEK IZAZOV!**

Krioprezervacija konjskih zametaka

- Yamamoto i sur., 1982 → prvo ždrijebe transferom smrznutog zametka
- KAPSULA JE PROBLEM!!!!
- od 1982. do 1998. transferirana 552 zametka → gravidnost 106/552 (**19,2%**) uz dodatne pobačaje od 14% (15/106).

Problematika konjskih zametaka

- **Kapsula** (tripsin), masne vakuole, intenzivnija diobena aktivnost
- mladi konjski zametci bolje podnose jer im je KAPSULA TANJA
- teško oformiti homogenu skupinu zametaka; malo zametaka
- zametci 160-200 μ m (300 μ m?) podnose smrzavanje

-
- sporo smrzavanje
 - vitrifikacija - veća uspješnost transfera, još bez ždrijebadi; $B \leq 300\mu\text{m}$ jednako podnose kao $B < 200\mu\text{m}$

SPORO SMRZAVANJE

- izvući vodu iz stanica zametka – intracelularni kristali leda su opasni
- Tretman zametaka hiperosmotskim otopinama krioprotektora (netraumatski kristali)



krioprotektori

- org. otapala za zaštitu zametaka pri krioprezervaciji, pohrani i otapanju
- **permeabilni** – EG, DMSO, GLY,...; mala Mr do 400 (idealni - visoko topljivi, permeabilni, netoksični)
- **nepermeabilni** – male ili velike Mr; saharoza, šećeri, šećerni polimeri, škrob; važni posebice pri **otapanju!** jer onemogućuju nagli ulaz molekula vode u stanice nakon otapanja (bubrenje). Prije smrzavanja djeluju osmotski.

- dehidracija pa ekvibracija
- Osmotski i toksični učinak KP (rastuće konc., ne predugo)
- kapsula sprječava penetraciju KP
- punjenje zametka u pjetu i stavljanje u programirani smrzivač
- indukcija kristalizacije – **seeding**: inače bi došlo do supercoolinga (-20C) i nekontrolirane kristalizacije



Krioprezervacija (EG, GLY)

Pokusne skupine (1-4) EG, 10 zametaka po skupini

	5min	5min	5min	5min	5min
■ kontrolna 1,5M–8,4%	2,1%	4,2%	6,3%	8,4%	8,4%
■ inferiorna 1M–5,6%	2,1%	4,2%	5,6%	5,6%	5,6%
■ Superiorna 2M–11,2%	2,1%	4,2%	6,3%	8,4%	11,2%
■ direktna 1,5M–8,4%	8,4%	8,4%	8,4%	8,4%	8,4%

Pokusne skupine GLY, 20 zametaka po skupini

	5min	5min	5min	5min	5min
■ kontrolna 1,3M–10%	2,5%	5%	7,5%	10%	10%
■ direktna 1,3M–10%	10%	10%	10%	10%	10%

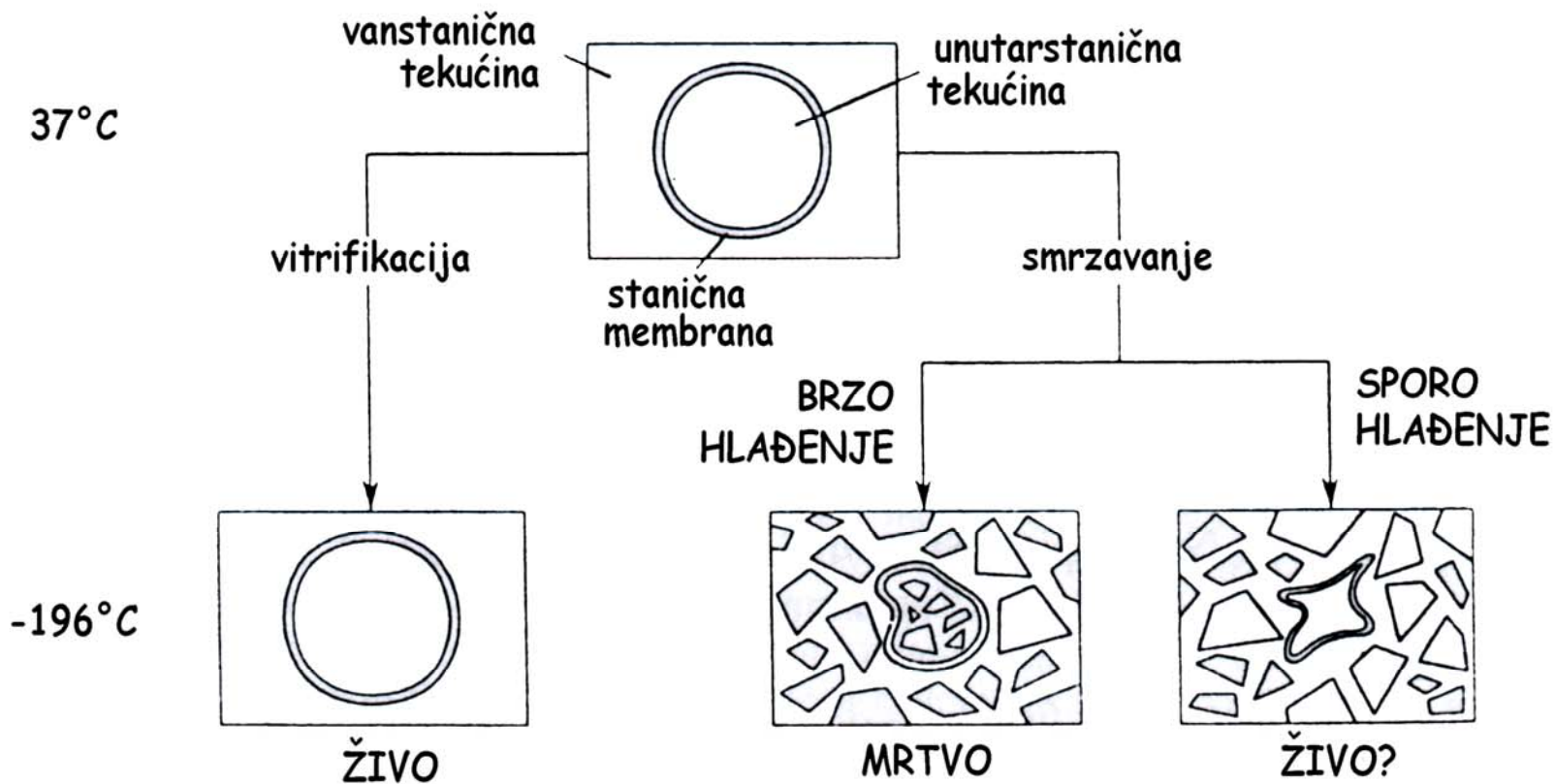
Pokusna skupina 7 OPS vitrifikacija, 20 zametaka

■	3min	40s
■	7,5%EG	18%EG
■	+7,5%DMSO	+18%DMSO
		+ 0,4M saharoza

vitifikacija

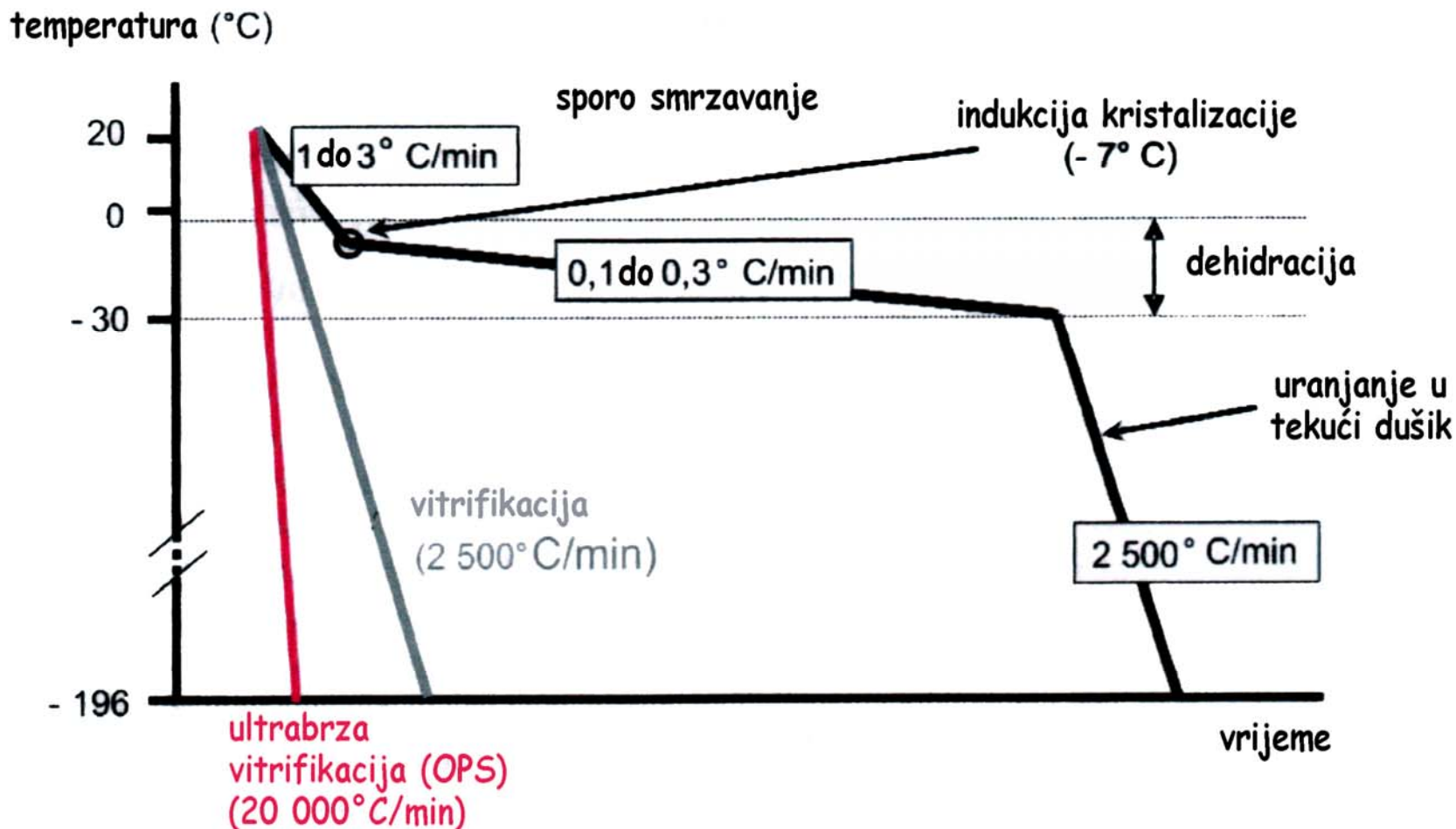
- dehidracija zametka kratkim izlaganjem koncentriranim otopinama KP te izravno uranjanje u N₂
- premošćivanje faze stvaranja kristala
- staklasto, amorfno stanje
- striktno pridržavanje protokola - toksičnost
- ultrabrza vitifikacija – OPS, cryoloop

Konjski zametci su VRLO OSJETLJIVI na smrzavanje

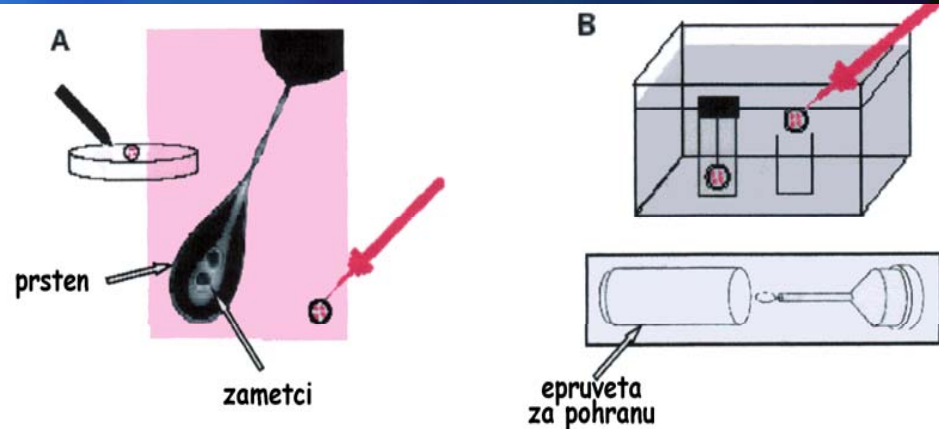
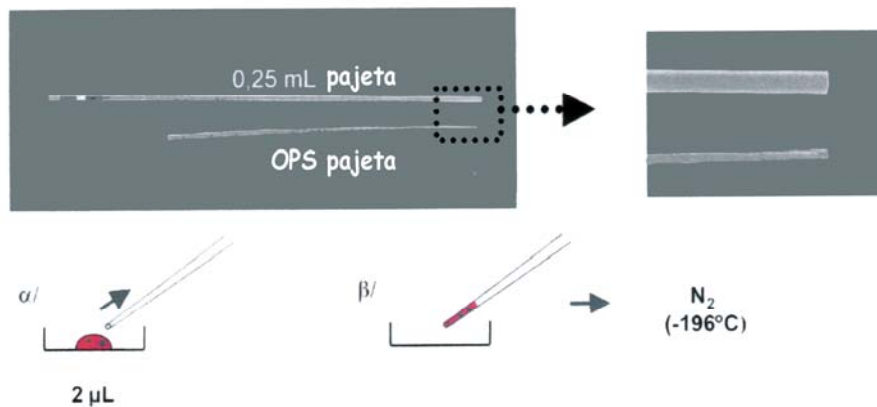
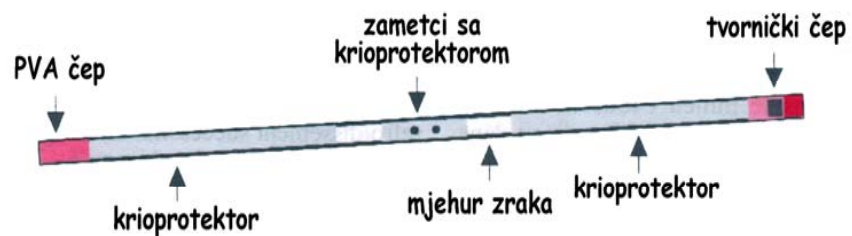


Fahy, G.M. (1995).

Tehnike krioprezervacije



Punjenje zametaka u pajete



Guignot, F. (2005).

Hlađenje i smrzavanje

- Programirani smrzivač
- Uranjanje u dušik
- OPS – izravno uranjanje



Oštećenja zametaka

- toksičnost i permeabilnost krioprotektora
- smrzavanje (brzina hlađenja, intracelularna tvorba leda, efekt otopine)
- brzo otapanje (rekristalizacija!)

Otapanje zametaka

- Pajeta 30s u kupelj 37°C, (2500°C/min)
- Isprazniti pajetu u jažicu
- Mjerenje zametka, fotografiranje, ocjenjivanje
- pasiranje zametka kroz niz otopina padajućih koncentracija KP uz saharozu kroz 5' – spriječiti osmotsko bubrenje!
- OPS – 5' na zraku pa pasaža kroz otopine saharoze 1' i 5'

Otapanje zametaka (EG)

- **kontrolna:** 6,3% EG + 0,25M saharoza 5'
- **i direktna** 4,2% EG + 0,1M saharoza 5'
- **skupina** 2,1% EG + 0,1M saharoza 5'
- F1 + 0,1M saharoza 5'
- F1 5'
- **superiorna** 10,5% EG + 0.25M saharoza 5'
- **skupina:** 8,4% EG + 0,25M saharoza 5'
- 6,3% EG + 0,25M saharoza 5'
- 4,2% EG + 0,1M saharoza 5'
- 2,1% EG + 0,1M saharoza 5'
- F1 + 0,1M saharoza 5'
- F1 5'
- **inferiorna** 4,2% EG + 0,1M saharoza 5'
- **skupina:** 2,1% EG + 0,1M saharoza 5'
- F1 + 0,1M saharoza 5'
- F1 5'

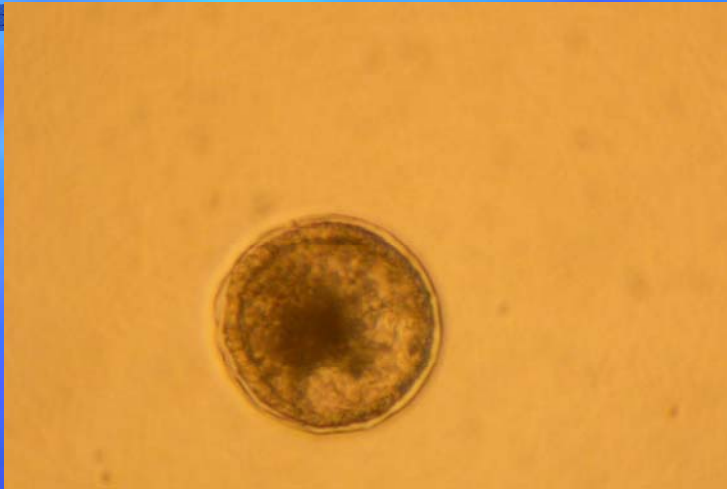
Otapanje zametaka (GLY)

- **kontrolna:** 7,5% GLY + 0,25M saharoza 5'
- **i direktna** 5% GLY + 0,1M saharoza 5'
- **skupina** 2,5% GLY + 0,1M saharoza 5'
- F1 + 0,1M saharoza 5'
- F1 5'

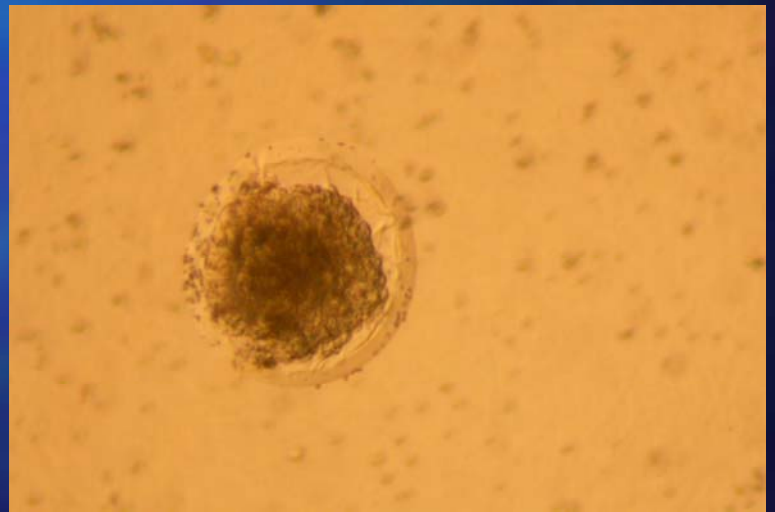
Otapanje zametaka (OPS vitrifikacija)

- MB + 0,2M saharoza 1'
- MB + 0,2M saharoza 5'
- (MB + 0,1M saharoza) 5'
- (MB) 5'
- (MB) X'

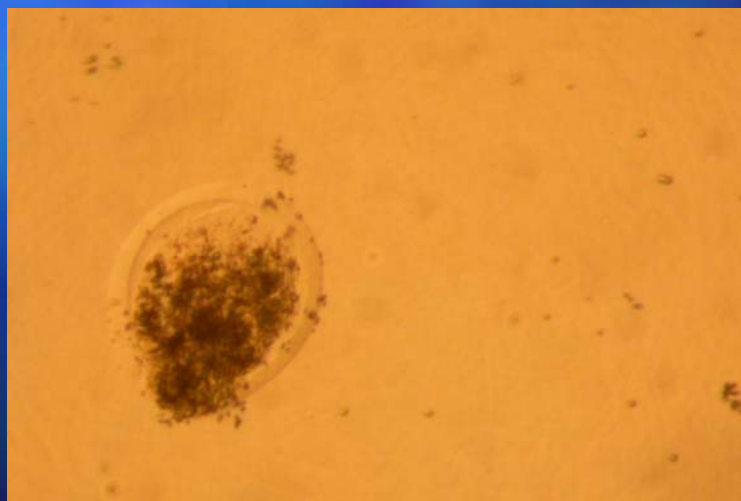
Par primjera...loš



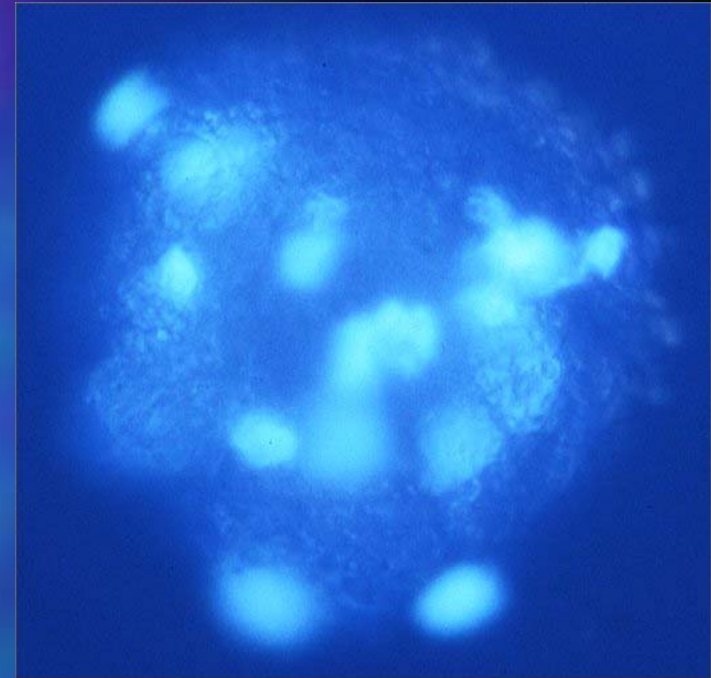
...dobar



Zametci koji nisu dobro podnijeli otapanje...



Nakon otapanja



- Ocjena vitalnosti zametaka i odabir za transfer

- Ocjena: transfer (+ ili -)

- Morfološka ocjena
- Razvoj u kulturi
- Mjerenja metaboličke aktivnosti

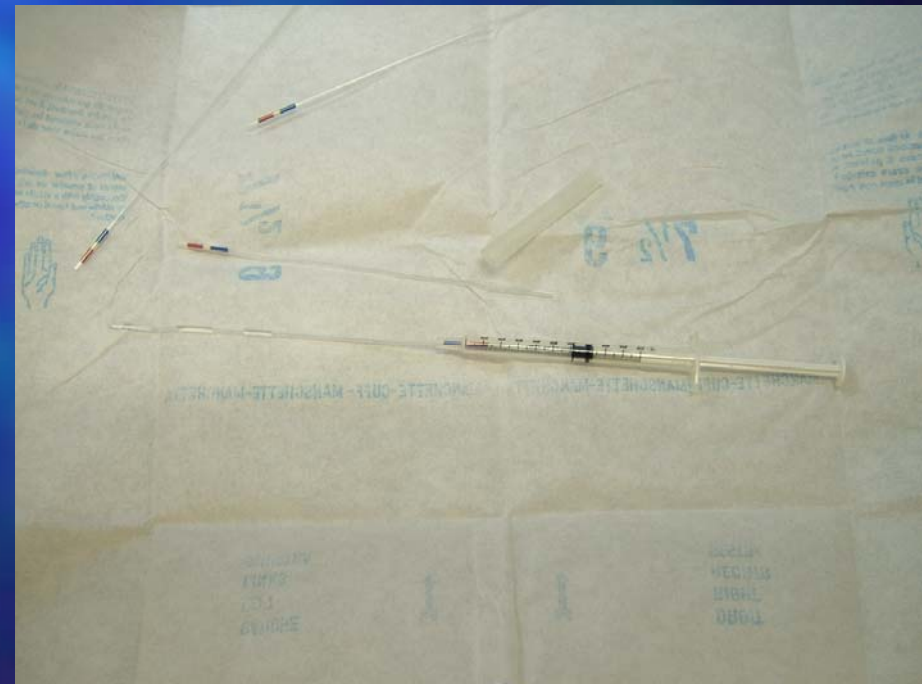
Utvrđivanje živih stanica: bojanje fluorescirajućim tvarima (FDA, Hoechst), BrdU, orcein acetat

Utvrđivanje mrtvih stanica: propidij jodid, DAPI, TUNEL

Histološka istraživanja

Transfer zametaka nakon otapanja

- kirurški transfer zametaka



Transfer otopljenih zametaka

- Kirurški transfer – laparotomijski u desnoj paralumbalnoj jami, u vrh roga
- Kobile primateljice spontano ovulirale 5d ranije
- UZV moguć već 5d nakon transfera



Dijagnostika nakon transfera

- UZV moguć već 5 dana nakon transfera



zametak star 12d
dobiven ispiranjem
primateljice

Rješenje za probleme

- selektirati zametke na stadij razvoja (morule i mlade blastociste) i na veličinu 185-200 (max300) μm
- Lascombes i Pashen ostvaruju 55% u 10% GLY sa zametcima <220 μm
- Hudson i sur. sa OPS-om 70% sa zametcima do 185 μm

