

ASISTIRANA REPRODUKCIJA U VETERINARSKOJ MEDICINI

Doc. dr. sc. Iva Getz

Studenii, 2009.

**ASISTIRANA
REPRODUKCIJA**

termin u humanoj medicini

=

**BIOTEHNOLOGIJA
RASPLOĐIVANJA**

termin u veterini

METODE BIOTEHNOLOGIJE RASPLOĐIVANJA (ART*):

- I generacija - UMJETNO OSJEMENJIVANJE
- II generacija – EMBRIOTRANSFER
- III generacija – PROIZVODNJA ZAMETAKA
IN VITRO
- IV generacija – MANIPULACIJA ZAMECIMA,
KLONIRANJE, TRANSGENEZA

*ART = Assisted Reproductive
Technologies

ASISTIRANA HUMANA REPRODUKCIJA (POTPOMOŽNUTA OPLODNJA):

Tehnike u liječenju neplodnosti (steriliteta):

- IUI - intrauterina inseminacija
- ITI - intratubarna inseminacija
- IVF - izvantjelesna oplodnja
- ISCI - intracitoplazmatsko injiciranje spermija
- GIFT – povrat gameta u jajovode laparoskopskim postupkom
- Krioprezervacija – smrzavanje/odmrzavanje jajnih stanica i zametaka

BIOTEHNOLOGIJA RASPLOĐIVANJA → GENETSKO POBOLJŠANJE

ČIMBENICI:

- 1. Genetska varijacija (varijabilnost)
- 2. Preciznost u selekciji
- 3. Intenzitet selekcije
- 4. Generacijski interval

- Inbreeding (srodstvo)

Biotehnološka metoda I. generacije UMJETNO OSJEMENJIVANJE

- učinkovito poboljšanje intenziteta i preciznosti selekcije korištenjem sjemena progeno testiranih bikova;
- povećanje efikasnosti proizvodnje mlijeka i mesa;
- sprečavanje širenja zaraznih bolesti;
- međunarodna trgovina kvalitetnim genetskim materijalom.

Biotehnološka metoda II. generacije EMBRIOTRANSFER (MOET)

- **EMBRIOTRANSFER** = biotehnološki postupak kojim se genetski kvalitetnim davateljicama u ranom graviditetu ispiru zametci iz maternice koji se zatim prenašaju u maternicu istovrsne primateljice kako bi nastavili intrauterini razvoj.

Ciljevi MOET-a

- Širenje genoma najkvalitetnih plotkinja
- Zamrzavanje zametaka - međunarodni promet i trgovina zamecima, uvoz genetike
- Veterinarsko sanitarna kontrola - sprečavanje širenja zaraznih bolesti
- Dobivanje potomstva od sekundarno jalovih krava
- Primjena drugih biotehnoloških postupaka poput cijepanja i seksiranja zametaka
- Očuvanje autohtonih i ugroženih pasmina

Povijest embriotransfera

- 1891. Prvi uspješan embriotransfer u kunića
- 1933. Rođenje štakora nakon embriotransfera
- 1949. Rođenje prvog janjeta i jareta nakon embriotransfera
- 1951. Rođenje prvog prašćića nakon embriotransfera
- 1951. Rođenje prvog teleta nakon embriotransfera
- 1973. Rođenje prvog teleta nakon transfera duboko smrznutog zametka

Povijest embriotransfera u RH

Međunarodni projekt: "Mogućnost prijenosa viroza u svinja embriotransferom" – 1985./86. glavnog istraživača prof. dr. sc. Miroslava Heraka

Projekt Ministarstva znanosti i tehnologije "Embriotransfer u krava" (1992.-1996.) glavnog istraživača prof. dr. sc. Zdenka Makeka – utemeljen Laboratorij za asistiranu reprodukciju

- rujan 1995. - prvo ET tele u Republici Hrvatskoj

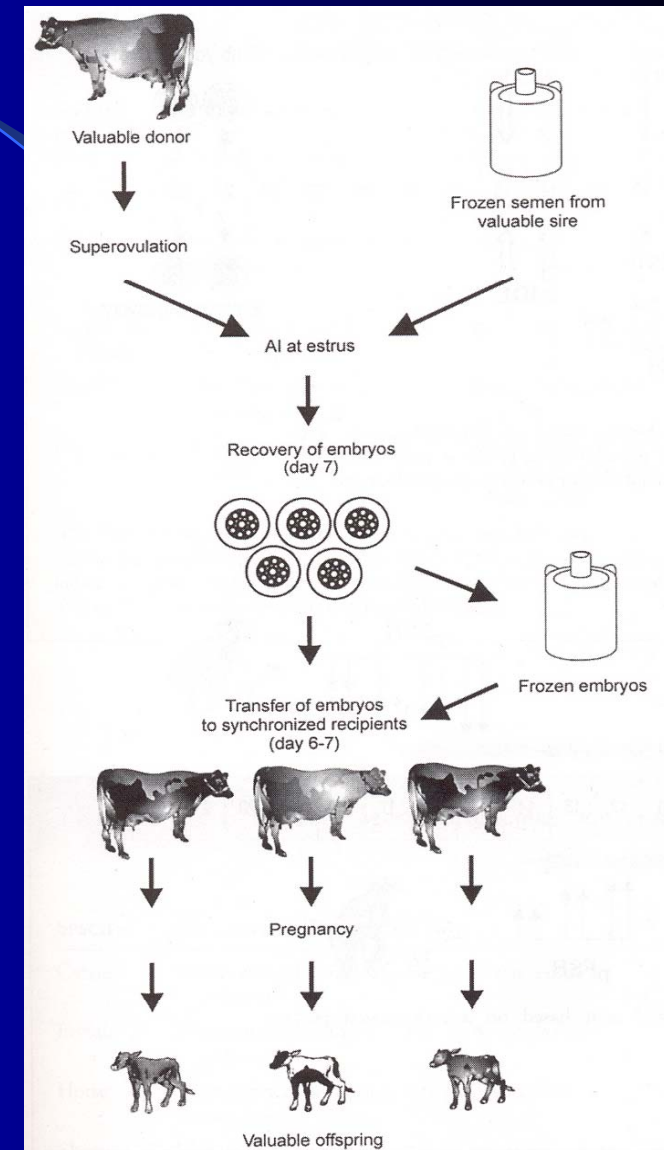
Projekt MZT "In vitro oplodnja u goveda" (1997.-) glavnog istraživača prof. dr. sc. Zdenka Makeka

- svibanj 2001. – prvo IVP tele u Hrvatskoj

Biotehnoška metoda II. generacije EMBRIOTRANSFER (MOET)

Multipla ovulacija i embriotransfer:

- Izbor davateljica i primateljica
- Superovulaciju davateljica (PMSG, FSH)
- U.O. davateljica
- Ispiranje maternice davateljica (polučivanje zametaka) 6. ili 7. dana nakon U.O.
- Transfer svježih ili DS zametaka u sinkronizirane primateljice



Izbor krava davateljica

2 osnovna kriterija:

- Genetika
- Sposobnost proizvodnje velikog broja zametaka

Izbor krava davateljica

- Uzgojne vrijednosti davateljice:
 - Proizvodni rezultati davateljica i njenih potomaka (% odbijene teladi, mliječnost, prirast)
 - Kondicija i eksterijer
 - Podrijetlo i nasljedstvo
 - Eventualo prethodna povijest uspjeha u embriotransferu

Izbor krava davateljica

- Reprodukcijske vrijednosti davateljica:
 - Optimalna reprodukcijska dob (3-8 godina)
 - Visok stupanj plodnosti
 - Uredni ciklusi
 - Normalno teljenje
 - Uredan puerperij
 - Zdravi spolni organi
 - Dobro razvijeno vime

Izbor krava i junica primateljica

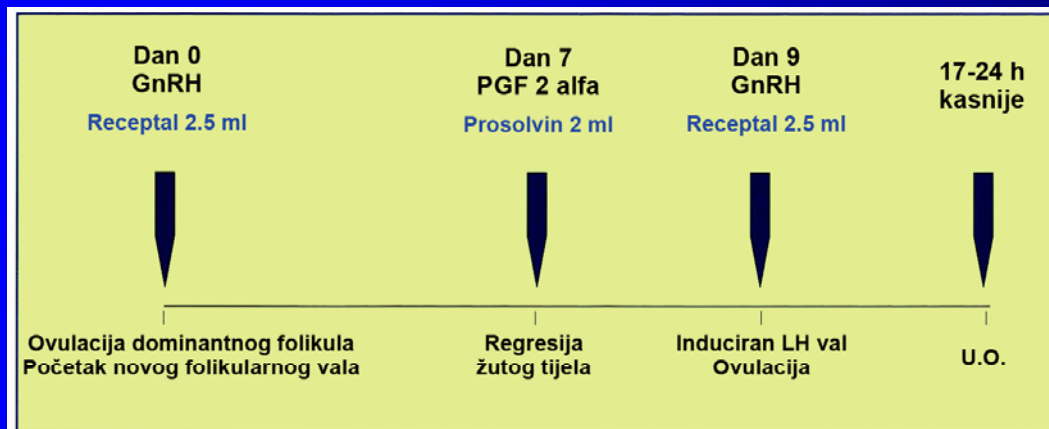
- 1 davateljica : 7 primateljica, odnosno 2 : 10 (direktni ET)
- Junice ili mlade krave s besprijekornom plodnošću, koje ne moraju biti uzgojno vrijedne, ali:
 - dobrog zdravlja i kondicije
 - zdravih spolnih organa (pratiti najmanje 1 spolni ciklus)
 - dobre mlječnosti
 - moraju koncipirati brzo i lagano
 - poslije telenja normalno ući u ciklus

Izbor krava i junica primateljica

- Prednosti junica primateljica:
 - dostupnije i jeftinije
 - bolje odgovaraju na postupak sinkronizacije
 - nema puerperalnih infekcija, afunkcija jajnika i drugo
- Mane junica primateljica:
 - teža telenja – gubitak teladi
 - neprohodnost cerviksa (10 do 15%)
 - sindrom “velikog teleta” kod IVP zametaka

Sinkronizacija primateljica

- Transfer u spontanom estrusu
- Sinkronizacija s PGF
- Sinkronizacija s gestagenima (implantati, PRID, CIDR)
- Ovsync (GnRH – PGF – GnRH)



Management krava i junica primateljica

Otkrivanje estrusa - osnovni korak za uspješnost embriotransfera

PAŽLJIVO, SAVJESNO, TOČNO!!!

Sinkronizacija davateljica i primateljica (± 1 dan)

Optimalni rezultati kada su primateljice u estrusu nešto prije davateljica

Superovulacija davateljica

Stimulacija jajnika gonadotropnim hormonima

– dovode do rasta više folikula i multiple ovulacije

Započinje između 9. i 12. dana ciklusa - **kontrola C.L.!!!**

- PMSG preparati – jednokratna primjena uz aplikaciju $\text{PGF2}\alpha$ nakon 48 sati
- Purificirani ekstrakti hipofize svinja (**FSHp**) ili ovaca (**FSHo**) – dva puta dnevno tijekom 4 do 5 dana uz aplikaciju $\text{PGF2}\alpha$ 48 sati nakon prve aplikacije FSH

Sinkronizacija i superovulacija davateljica

Protokoli: razni, s različitim hormonima, razlike između pasmina te kategorija životinja



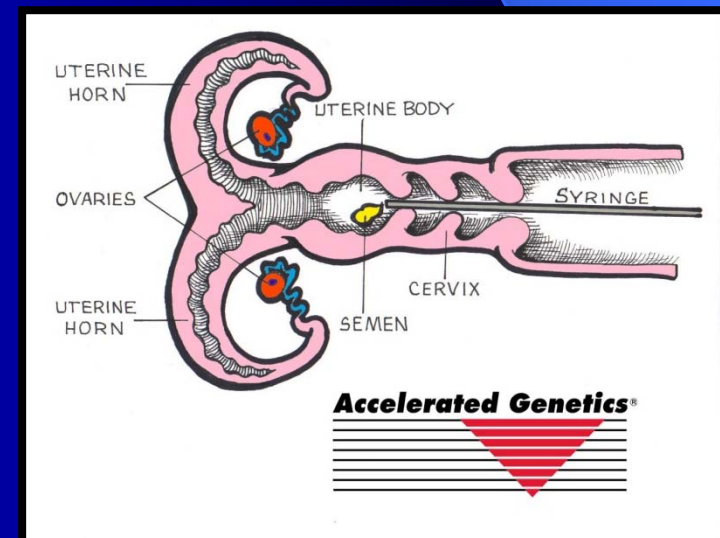
Hormoni: Prostaglandin, FSH/LH, GnRH

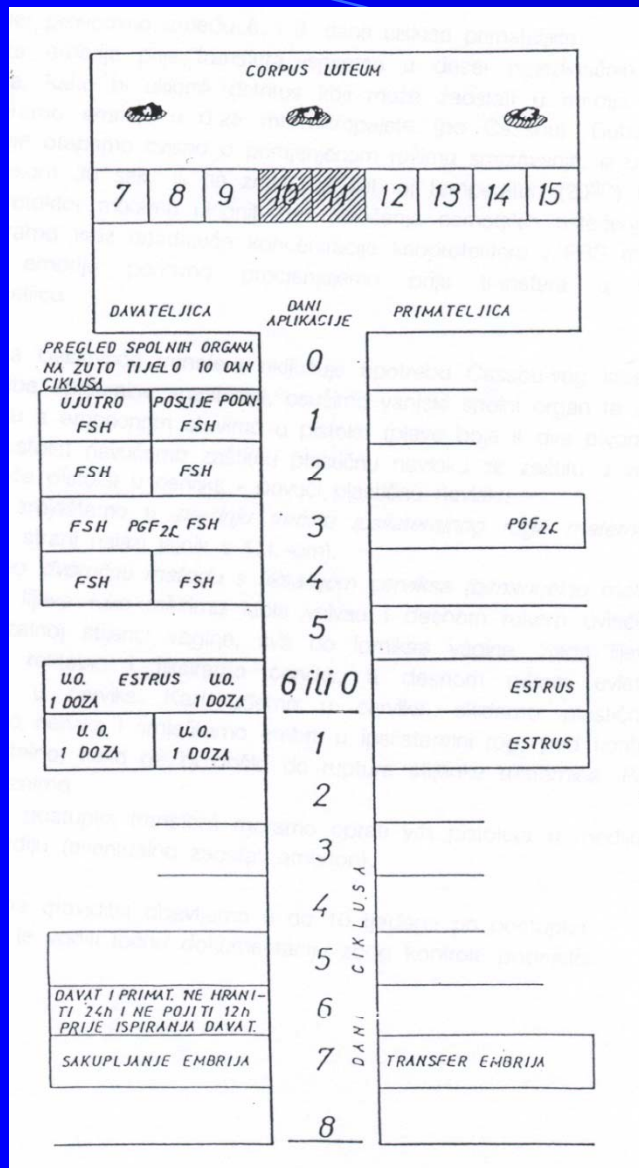
Umjetno osjemenjivanje: sjeme vrhunskih bikova dvokratno u maternicu

U.O. davateljica

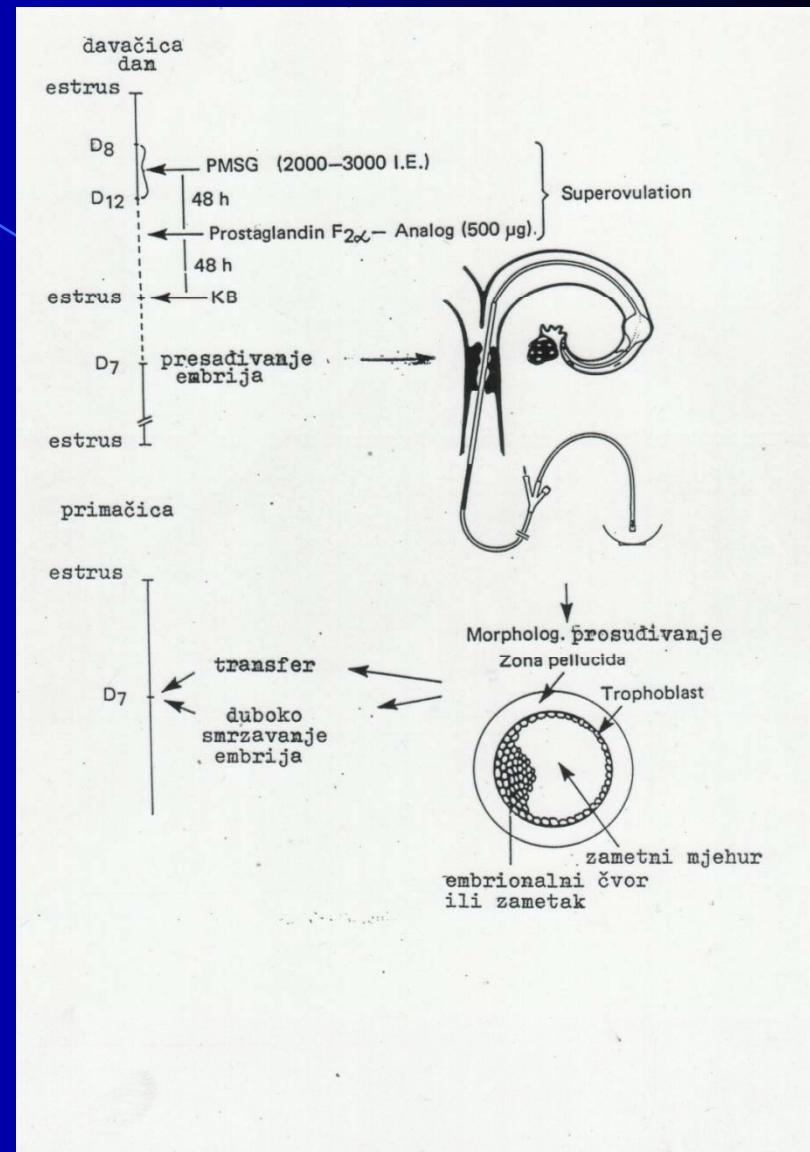
- višekratno (2 ili 3) u induciranom estrusu – 12 i 24 sata nakon početka estrusa
- sjeme kvalitetnih bikova visoke plodnosti
- kontrola kvalitete sjemena prije U.O. davateljica

Polaganje sjemena (2 doze) u svaki rog povećava postotak koncepcije – presudno iskustvo





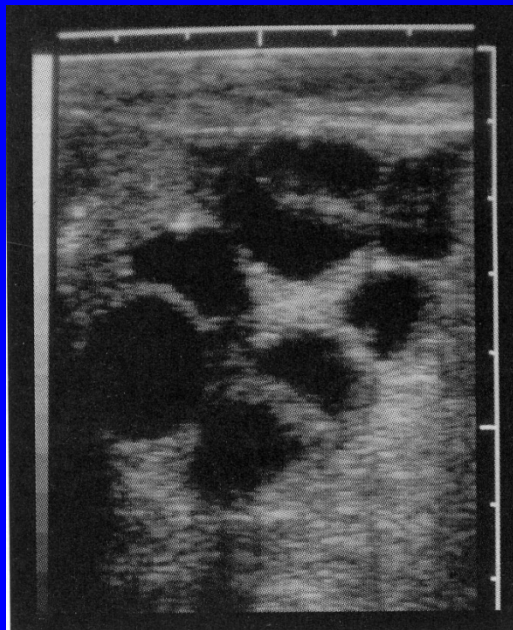
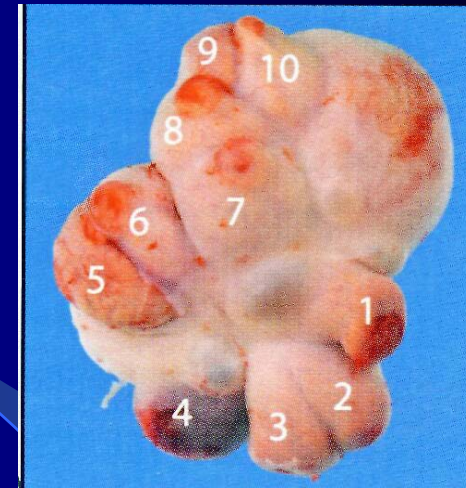
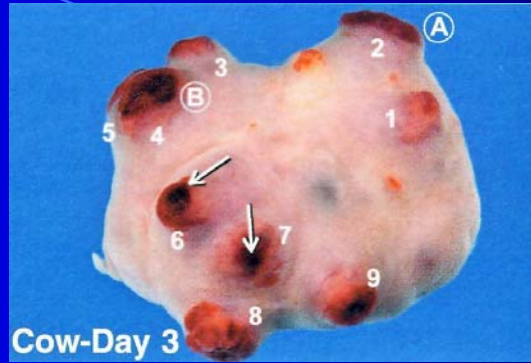
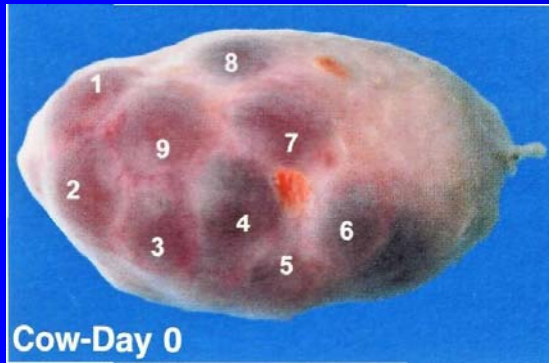
Superovulacija davateljica s FSH

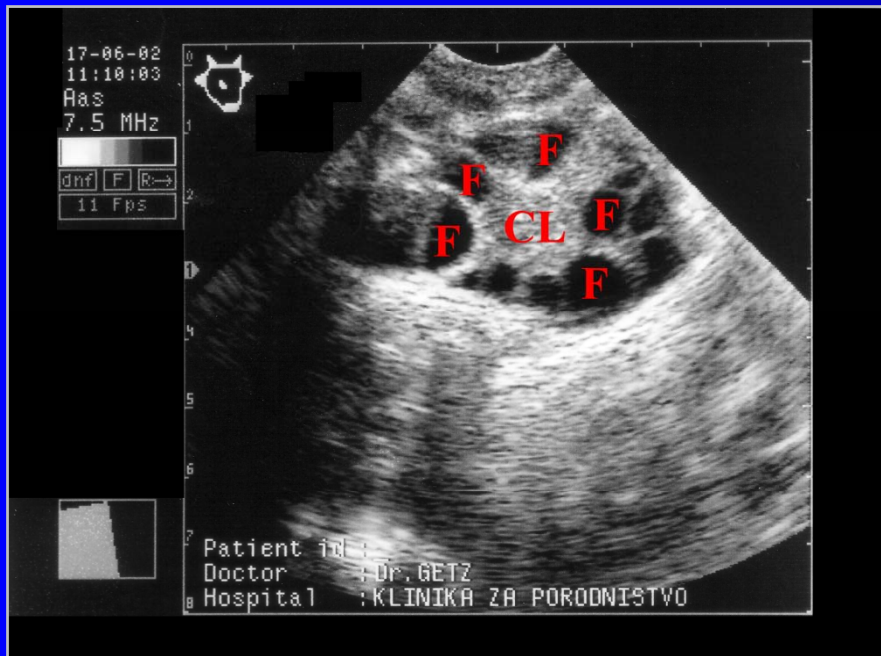


Superovulacija davateljica s PMSG

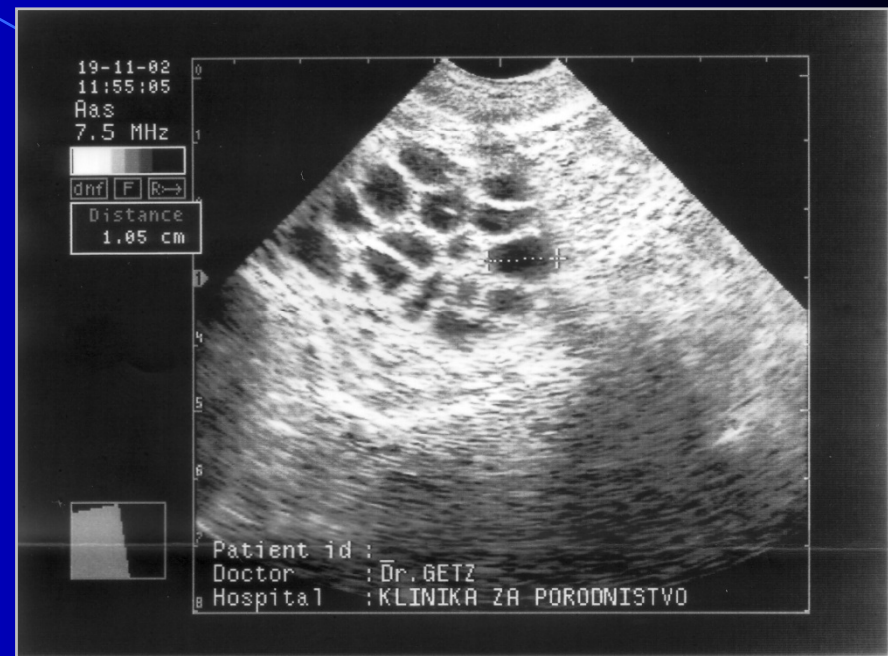
Rezultati MOET-a

- broj folikula / broj C.L.
 - superovulacija: 10 do 20 C.L.
 - 5 do 6 zametaka po kravi davateljici po ispiranju
 - 40 do 50% neoplođenih jajnih stanica
 - Postotak bređosti nakon transfera svježih zametaka iznosi 61%, a zamrznutih 50 do 60%
-
- Superovulacija davateljica - glavni ograničavajući čimbenik uspješnosti ET





Jajnik krave davateljice 3. dan superovulacije s FSH. Uočava se 5 folikula promjera 6 do 9 mm (F), nekoliko manjih te centralno smješteno žuto tijelo (CL).



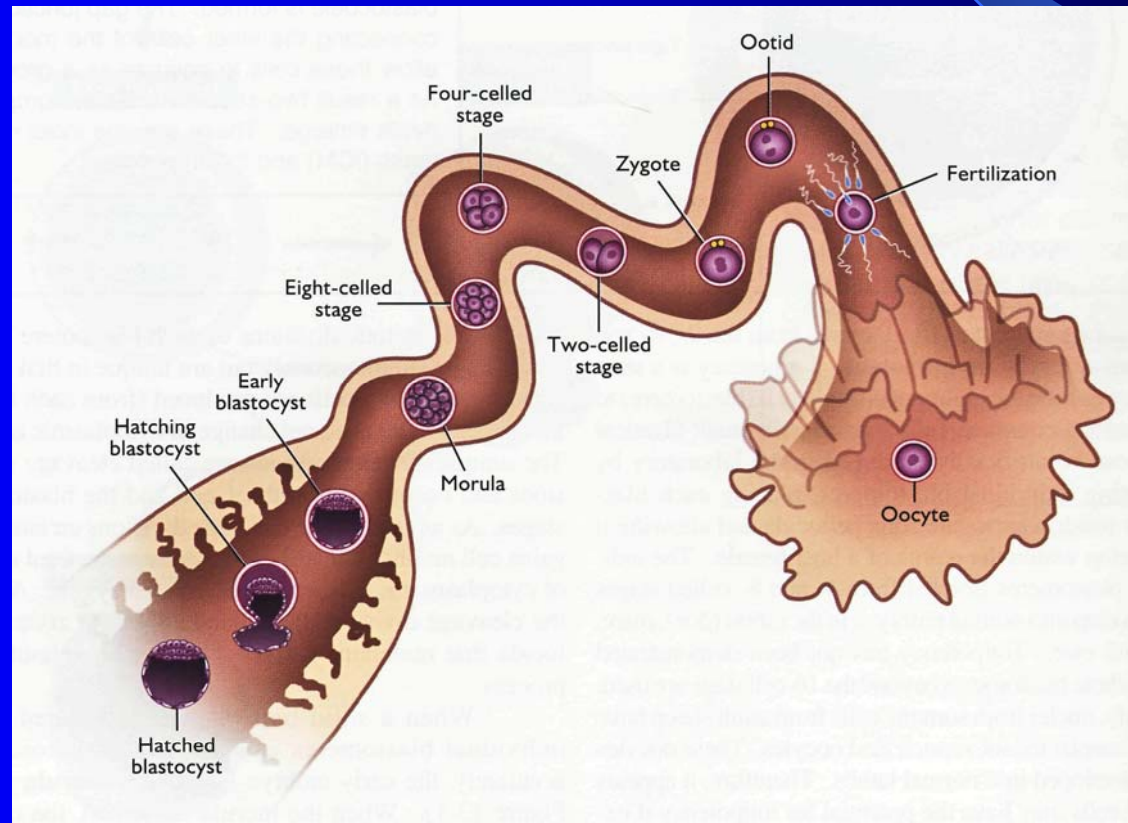
Jajnik krave davateljice 4. dan superovulacije s FSH.

Čimbenici koji utječu na uspjeh superovulacije:

- Dob
- Pasma
- Kondicija
- Hranidba – ne smije se mijenjati min 4 tj. prije ispiranja
- Držanje
- Laktacija
- Godišnje doba
- Prisustvo DF na jajnicima prije započinjanja superovulacije
- Genetika
- Stres

Ispiranje davateljica u ET postupku

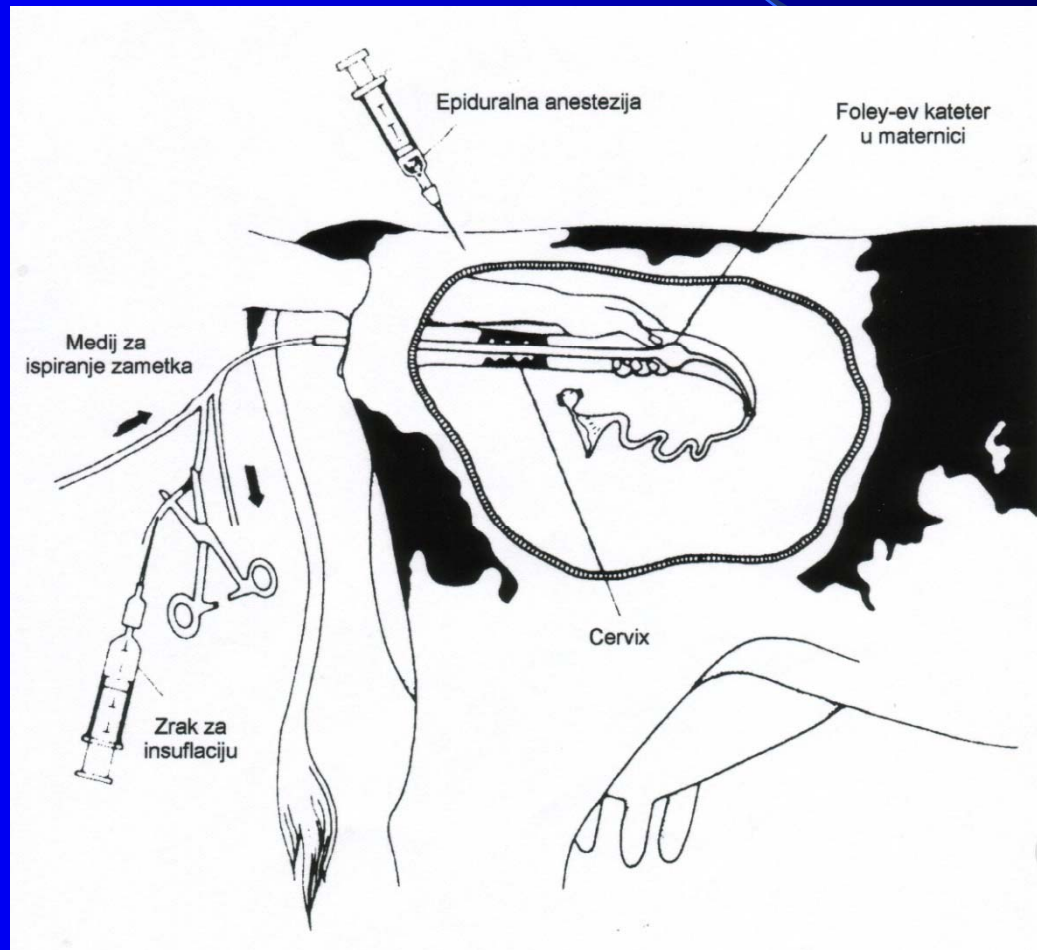
6. do 8. dan nakon induciranog estrusa



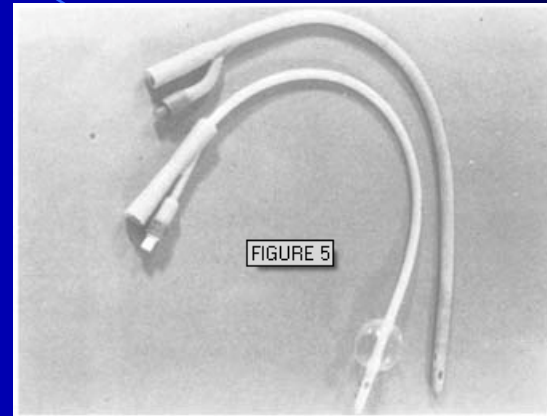
Ispiranje davateljica u ET postupku

- Nekirurško ispiranje rogova maternice
- Ocjena broja i kvalitete C.L.
- Epiduralna anestezija (5 ml 2% lidokaina)
- Pranje i dezinfekcija stidnice (70% alkohol)
- Sterilni dilatator za cerviks
- Foley kateter (18 do 24G) s mandrenom
- Sanitarna navlaka
- Boca s medijem zagrijana na tjelesnu temperaturu

Ispiranje davateljica u ET postupku



Ispiranje davateljica u ET postupku



Izolacija zametaka

Sistem bez filtera:

- Ispirak iz maternice sakuplja se u sterilne 2-litrene boce
- Sedimentacija kroz 20 minuta
- Odbacivanje sadržaja osim donjih 150 ml u drugu bocu
- Prebacivanje donjih 150 ml u petrijeve zdjelice za pretraživanje
- Ispiranje boce dvokratno s 20 ml medija zbog eventualno zaostalih zametaka
- Boca s odbačenim ispirkom se zaštiti od onečišćenja i svjetla

Izolacija zametaka

Sistem s filterom promjera pora 75 μm :

- Ispirak maternice prolazi kroz sistem sa filterom
- Zametci ostaju unutar filtera, ispirak se sakuplja u bocu radi eventualnog kasnijeg pretraživanja
- 1 cm medija treba stalno biti prisutan u filteru kako bi spriječili dehidraciju
- Sadržaj iz filtera se prebacuje u petrijevu zdjelicu za pretraživanje
- Filter se višekratno ispere zbog eventualno zaostalih zametaka
- Boca s odbačenim ispirkom se zašti od onečišćenja i svijetla

Izolacija zametaka

- Ispirak se pretražuje u pravokutnim petrijevim zdjelicama pod povećanjem 10-16x



Uvjeti držanja zametaka *in vitro*

Preživljavanje zametka *in vitro* ovisi o uvjetima koji ga okružuju:

- Medij
- Temperatura
- Izloženost svjetlu

Zametke možemo pohraniti u prikladnim medijima na temperaturi od 18-37°C do 12 sati

Danje svjetlo nije štetno ako je izloženost zametka do pola sata

Uvjeti držanja zametaka in vitro

Medij za održavanje zametaka (holding medium HM)

- Ispiru se deset puta u HM

Za kratki period uzgoja zametaka hranjive vrijednosti medija nisu od velike važnosti, za razliku od:

- pH
- Osmolarnosti
- Temperature
- Sterilnosti
- Netoksičnosti

Uvjeti držanja zametaka in vitro

Posuđe

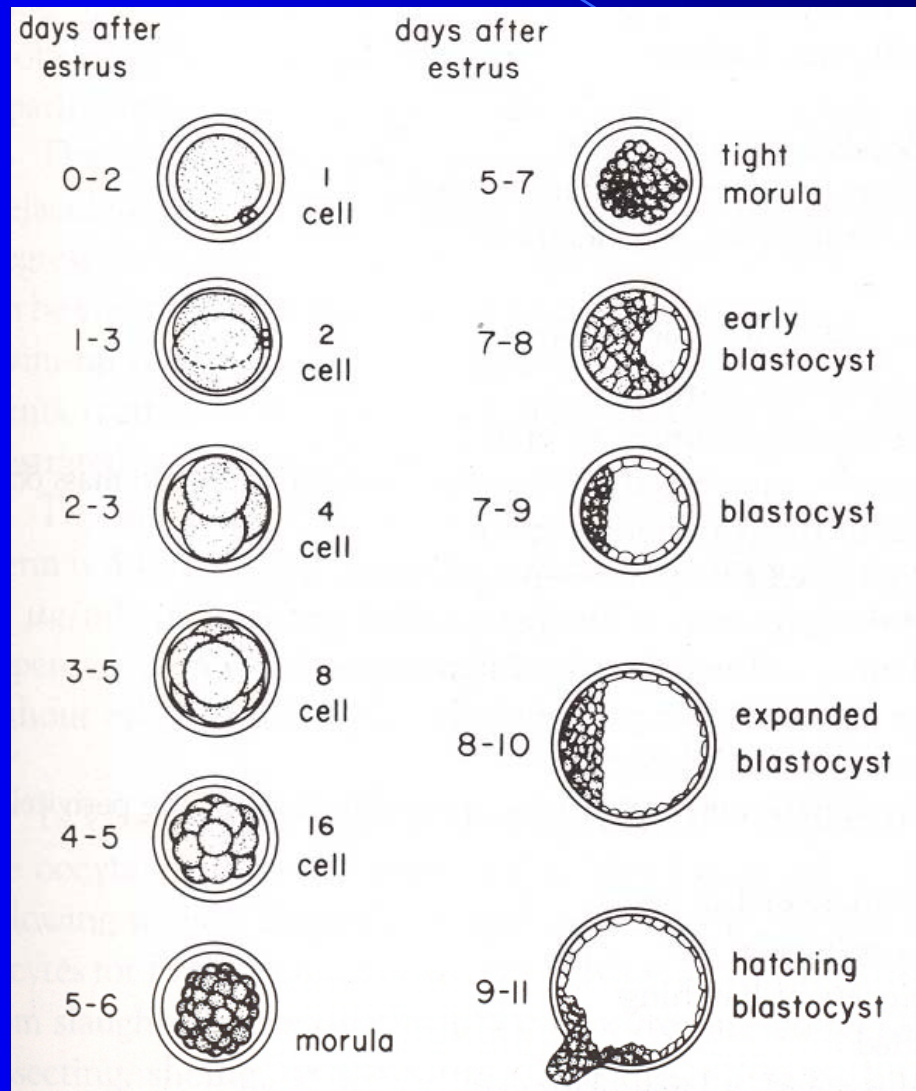
- Zametci se pohranjuju u male, sterilne, prozirne, zatvorene posude poput petrijevki, posuda s 4 plitice, epruveta malog volumena (<5ml)



Evaluacija zametaka

<u>Lokacija</u>	<u>Stadij razvoja</u>	<u>Dani nakon ovulacije</u>
Jajovod	1-stanični	0-1
	2-stanični	1-3
	4-stanični	2-3
	8-stanični	2-4
	rana morula	3-5
Maternica	kompaktna morula	4-6
	rana blastocista	6-7
	blastocista	6-8
	ekspandirana blastocista	7-9
	izlegnuta blastocista	8-10

Evaluacija zametaka



Evaluacija zametaka

Morfološka ocjena zametaka u različitim stadijima razvoja:

- subjektivna procjena morfoloških karakteristika zametka
- procjenjuje se pomoću mikroskopa pod povećanjem 20-40x
- procjenjuju se morfološke karakteristike zametka poput:
 - prisustva staničnih odlomaka;
 - stupanja kompaktizacije;
 - boje i kakvoće blastomera te
 - asinkronog brazdanja.

Evaluacija zametaka

Klasifikacija goveđih zametaka prema stupnju embrionalnog razvoja (IETS, 1993.):

Klasa	Stadij	Morfološki opis
3	Rana morula	16-32 nekompaktnih, velikih blastomera
4	Morula	32-64 kompaktnih, manjih blastomera
5	Rana blastocista	Blastocel < 50%
6	Blastocista	Blastocel > 50%
7	Ekspandirana blastocista	Promjer zametka raste a ZP postaje tanja
8	Izlegnuta blastocista	ZP je pukla, a zametak je djelomično ili potpuno izlegnut

Evaluacija zametaka

Pri klasifikaciji bilježimo slijedeće parametre:

- Starost
- Broj stanica
- Kompaktnost
- Razlike u veličini stanica
- Boja citoplazme
- Broj izbačenih blastomera
- Veličina perivitelinog prostra
- Stadij embrionalnog razvoja
- Retardacija

Evaluacija zametaka

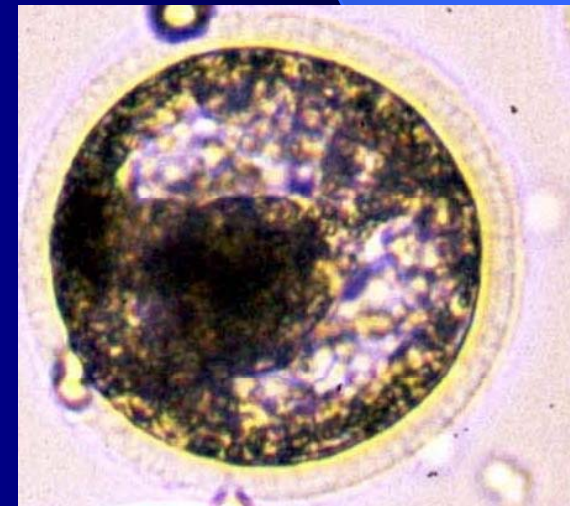
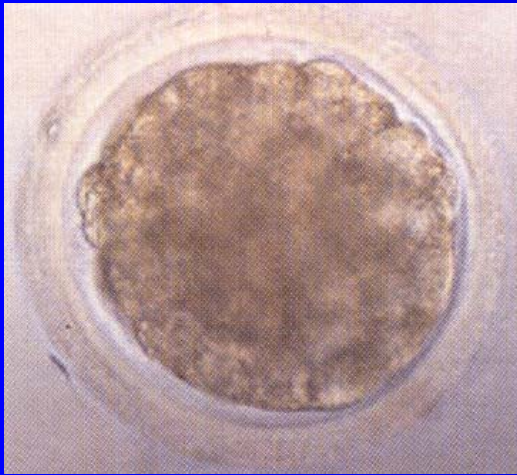
Prema stupnju kvalitete zametci se klasificiraju u četiri kategorije (IETS, 1993.):

- Stupanj 1: Zametci izvrsne ili dobre kvalitete
- Stupanj 2: Zametci osrednje kvalitete
- Stupanj 3: Zametci loše kvalitete
- Stupanj 4: Mrtvi ili degenerirani zametci

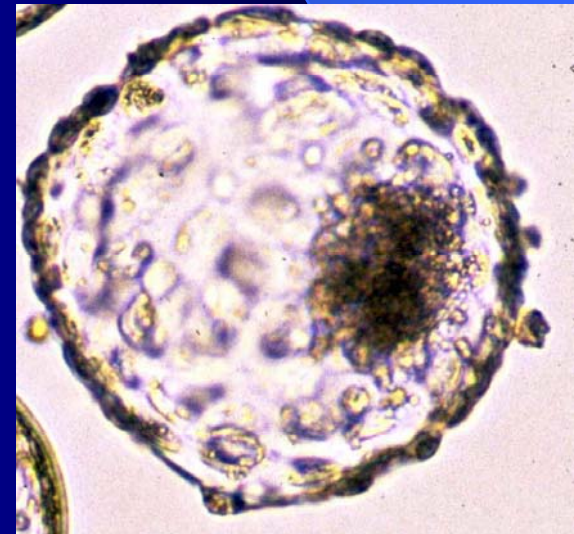
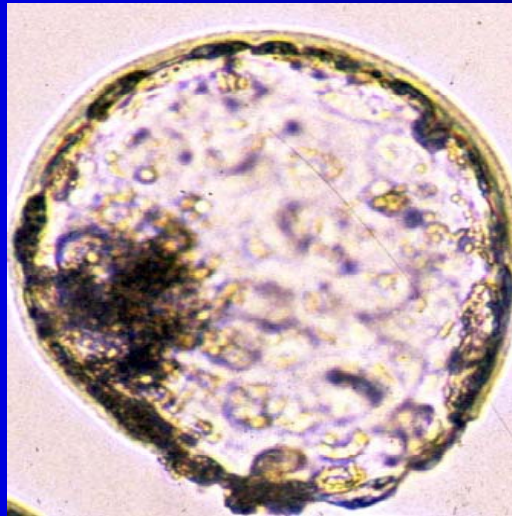
Evaluacija zametaka



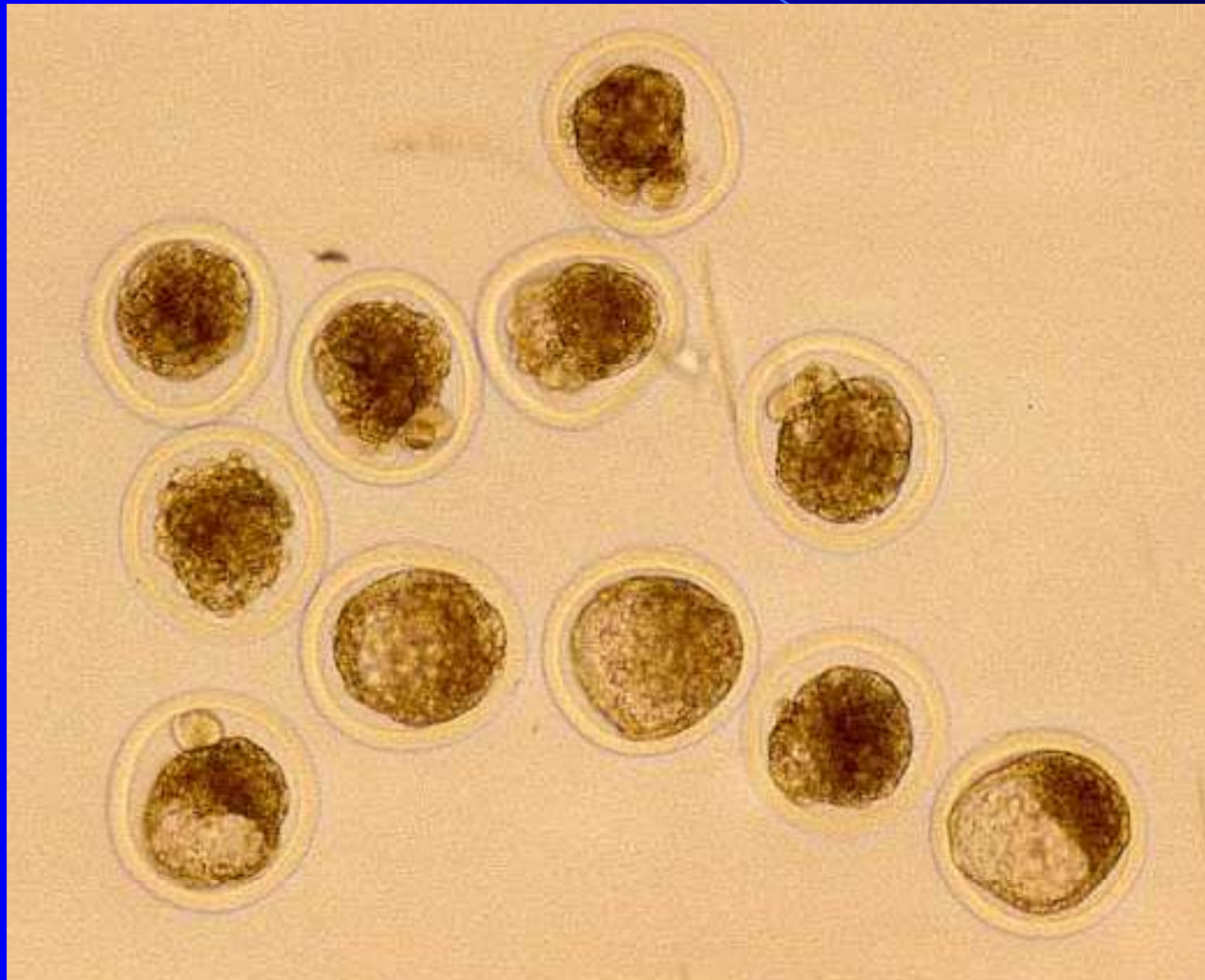
Evaluacija zametaka



Evaluacija zametaka



Evaluacija zametaka



Krioprezervacija zametaka

- Današnji protokoli omogućuju gotovo isti postotak gravidnosti (70-80% niži) kao kod transfera svježih zametaka
- Zamrzavaju se samo zametci izvrsne i dobre kvalitete
- Smrzavanje u roku 3-4 sata od ispiranja
- Prije smrzavanja potrebna je ekvibracija zametka u otopini krioprotektora : glicerol ili etilen glikol

Otapanje zametaka

- Vađenje pajete iz tekućeg dušika
- Otapanje: 0.5 cc: 20 sek na zraku + 20 sek u vodi 37 °C
0.25 cc: 15 sek na zraku + 15 sek u vodi 37 °C
- Rezanje pajete
- Ispuštanje sadržaja u petrijevu zdjelicu
- Izolacija zametka

Transfer zametaka u primateljice

Ipsilateralni rog maternice:

- Kirurški transfer
- Laparoskopski transfer
- Nekirurški transfer

Nekirurški transfer zametaka u primateljice

- Embriotransfer odmrznutih zametaka neposredno nakon otapanja. Ne smije se istodobno otopiti nekoliko pajeta.
- Po jednoj davateljici transferira se samo jedan zametak.
- Spriječiti traume endometrija.
- Stojnice, onemogućavanje naglih pokreta životinje te mirna i lagana manipulacija su jako važne u sprečavanju ozljeda kod ET.

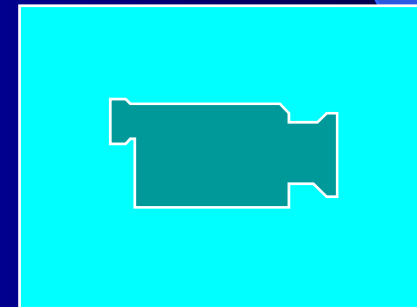
Nekirurški transfer zametaka u primateljice

- Kontrola kvalitete C.L.
- Epiduralna anestezija
- ET pistolet s plastičnom navlakom



Laparoskopski embriotransfer u košuta (*Cervus elaphus*)

- Anestezija: ksilazin + zolazepam, tiletamin
- Insuflacija CO₂: 10 mm Hg, 6-8 l
- Wolfov laparoskop 10 mm, 0 °
- Allisov forceps
- Duboko smrznuti/odmrznuti zameci
- Transfer 7. dana nakon induciranog estrusa



Međunarodno Društvo za Embriotransfer (IETS = International Embryo Transfer Society)

Donosi propise vezane uz sanitarnu kontrolu proizvodnje zametaka da bi se smanjio rizik mogućeg prijenosa zaraznih bolesti

Manual of the
International Embryo Transfer Society

Veterinarsko - sanitarna kontrola

Neophodna u prevenciji širenja zaraznih bolesti ET

Obuhvaća:

- Ocjena i praćenje sanitarnog statusa davateljica
- Sanitarni uvjeti tijekom ispiranja (zasebna sterilna oprema, aseptičan rad, sterilno laboratorijsko posuđe)
- Sanitarna kontrola medija
- Višekratno ispiranje zametaka (PBS+antibiotik+0.4% BSA) + ispiranje tripsinom

Rizik prijenosa zaraznih bolesti embriotransferom manji je nego prirodnim pripustom ili U.O. ako se slijede propisani postupci sanitarne kontrole (Stringfellow, 1985.)

Očekivani rezultati MOET-a

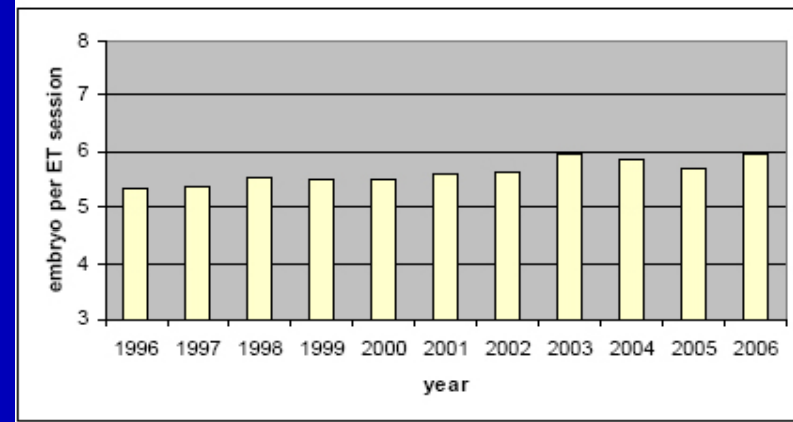
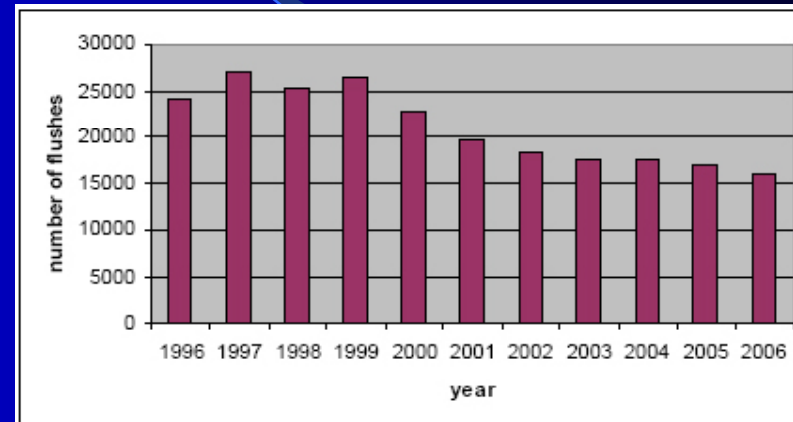
- MOET-om može se dobiti u prosjeku 5 kvalitetnih zametka po zahvatu.
- Postupak se može primjeniti na istoj životinji 3-4 puta godišnje.
- Tijekom jedne godine možemo dobiti 15-20 zametaka po kravi.
- Postotak bređosti je 50-70 % embriotransferom svježih zametaka.
- Postotak bređosti je 40-60 % sa zamrznutim zamecima.
- Po davateljici možemo očekivati 7-12 teladi godišnje.

Očekivani rezultati

- Ista se davateljica može svaki put oploditi sa različitim bikom - povećanje genetske raznolikosti.
- Primjena ET zamrznutih zametaka u "direktnom postupku", bez otapanja, daje 40-50% bređosti.
- Telad dobivena u potpunosti je morfološki i fiziološki jednako razvijena kao i telad dobivena prirodnim pripustom ili U.O.
- Omjer spolova je 1:1.
- Gubici (pobačaj) su oko 11%, a perinatalna smrtnost je oko 9%.

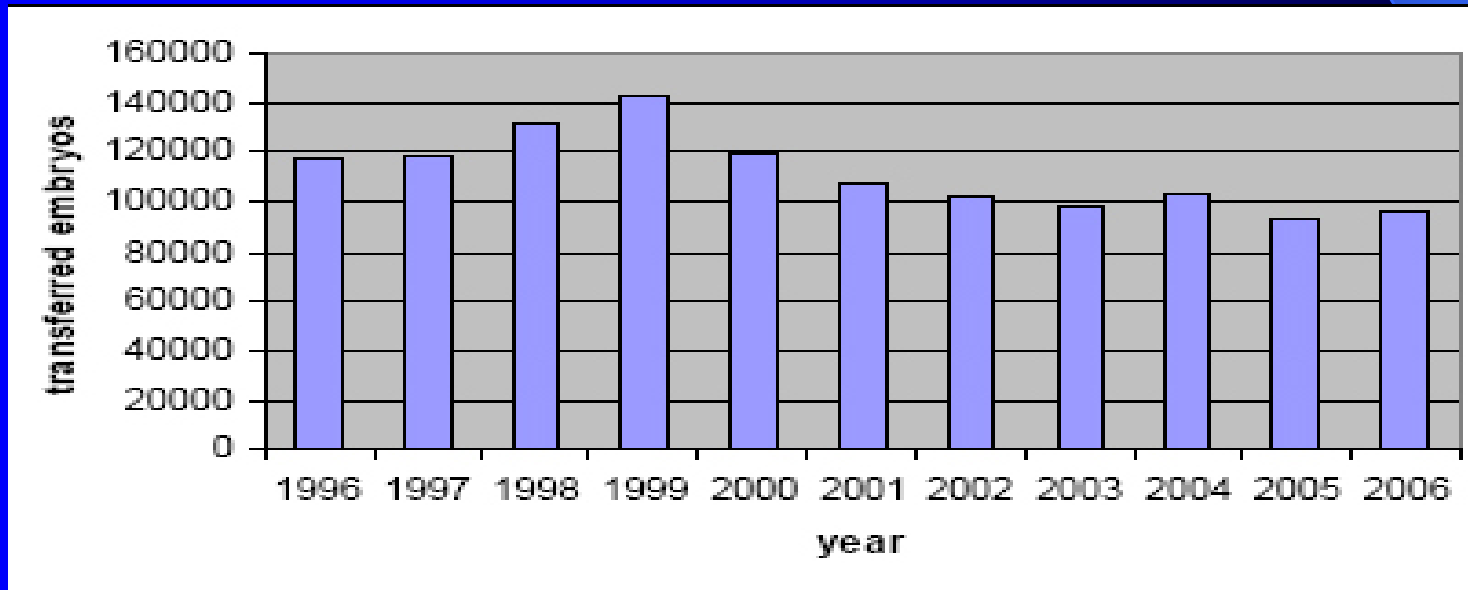
Statistički podatci o aktivnosti ET u Europi

- U 2006. ukupno je isprano 15 859 davateljica
- Prosjek: 5.93 zametka/davateljici
- U 2007. ukupno je isprano 18 287 davateljica
- Prosjek: 5.79 zametka/davateljici



Statistički podatci o aktivnosti ET u Europi

- U 2006. ukupno je transferirano 96 626 zametaka (58% smrznutih)
- U 2007. ukupno je transferirano 97 292 zametka (49 936 svježih/ 47 329 smrznutih)



Biotehnološka metoda III. generacije PROIZVODNJA ZAMETAKA *IN VITRO*:

- A. Polučivanje nezrelih jajčanih stanica
- B. Ocjena i kategorizacija jajčanih stanica
- C. Dozrijevanje in vitro (IVM)
- D. Oplodnja in vitro (IVF)
- E. Uzgoj zametaka in vitro (IVC)
- F. Transfer zametaka

A. Polučivanje nezrelih jajčanih stanica (KOK = kumulus-oocita kompleks)

Iz *klaoničkog materijala*:
jajnici junica ili krava:

- Aspiracijom folikula promjera 3 do 8 mm (periferni folikuli)

Iz *živih životinja*:

- Laparoskopskom punkcijom folikula
- Transvaginalnom ultrazvučnom punkcijom jajnika (OPU = ovum pick-up) superovuliranih ili krava u ciklusu



TRANSVAGINALNA ULTRAZVUČNA ASPIRACIJA JAJNIKA (OPU = Ovum Pick-Up) – mogućnosti primjene

- Alternativa klasičnom MOET-u;
- Višekratno ponavljanje OPU/IVF kod davateljica različitog fiziološkog statusa;

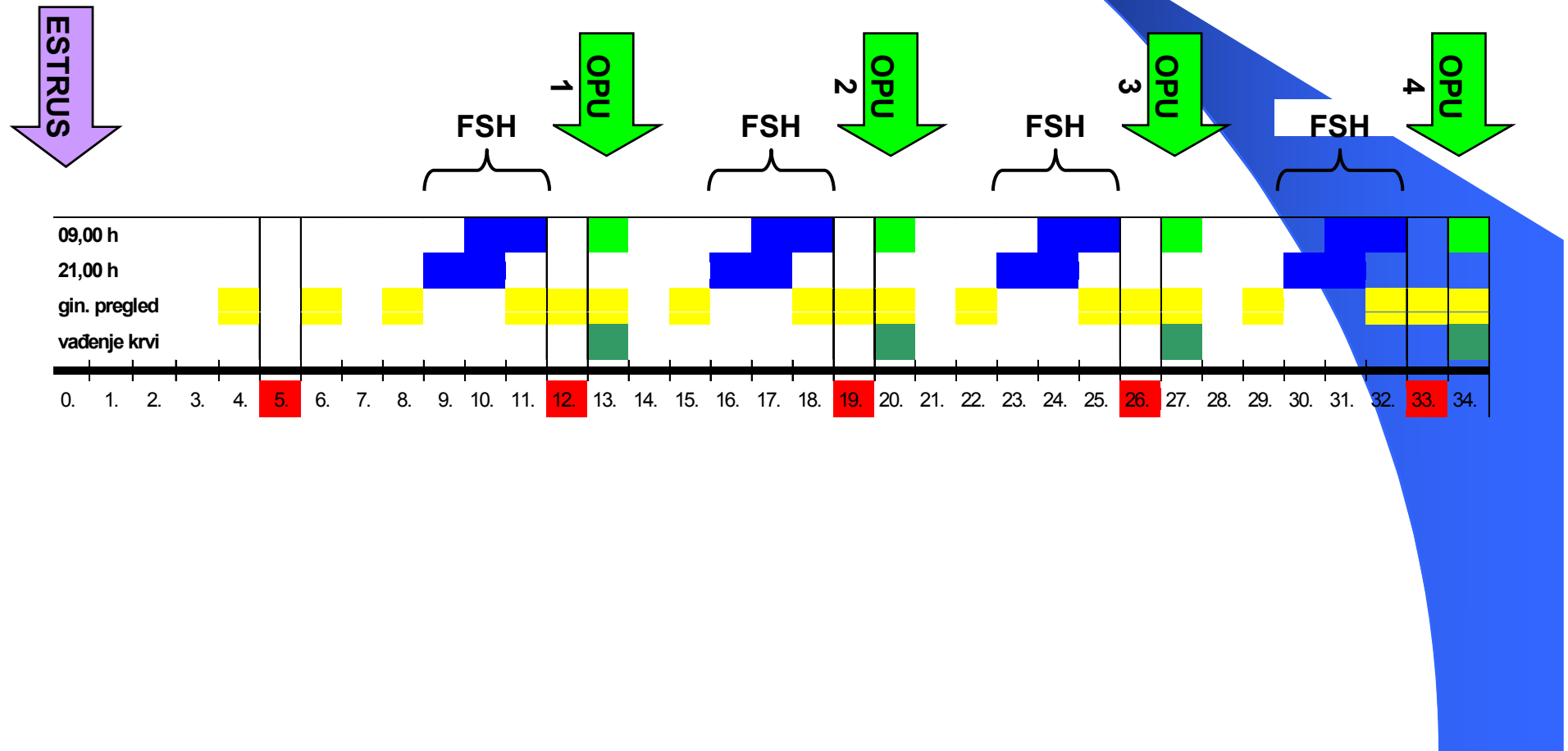
Stimulirane (PMSG, FSH, IGF, BST)

ili

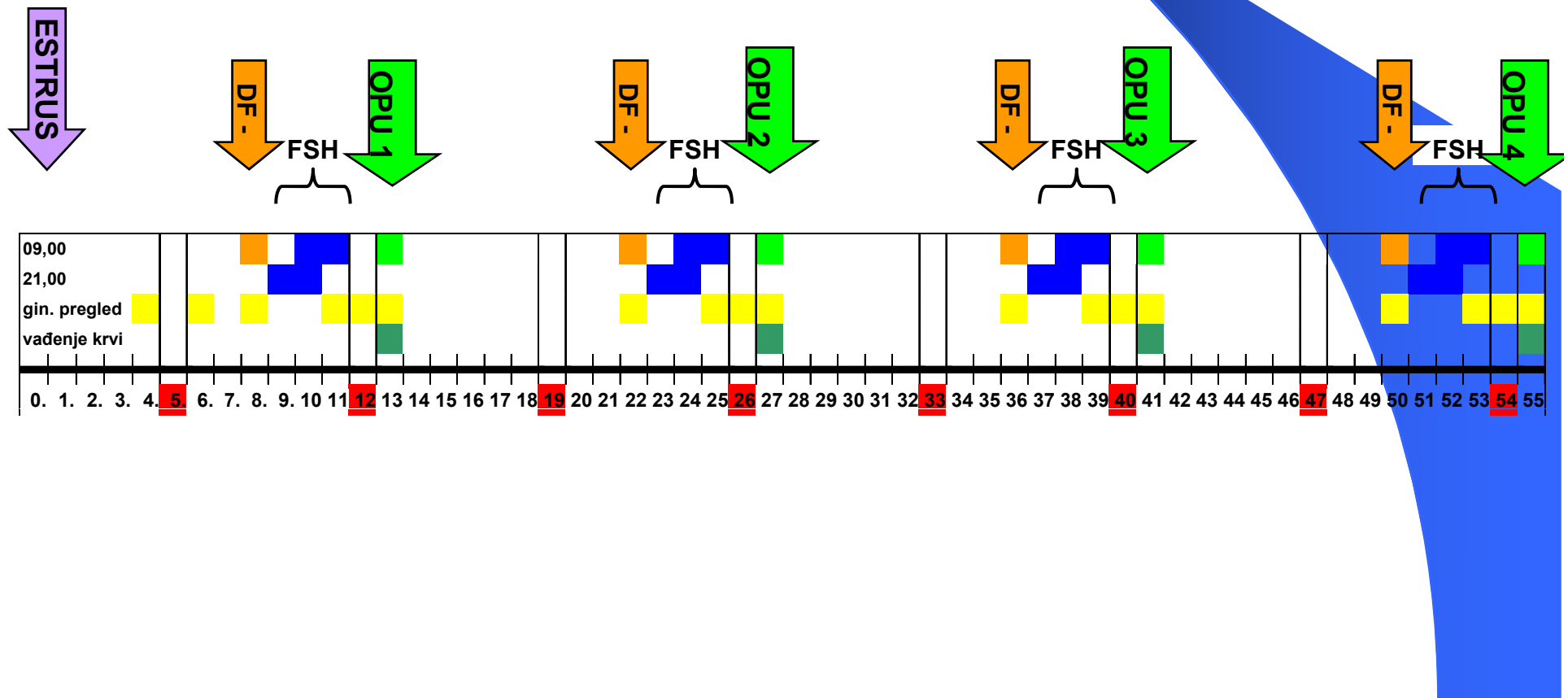
nestimulirane davateljice u ciklusu

- Dobivanje potomstva od sekundarno jalovih, genetski vrijednih plotkinja;

Stimulacija jajnika krava davateljica za OPU/IVF FSH skupina (n=8):



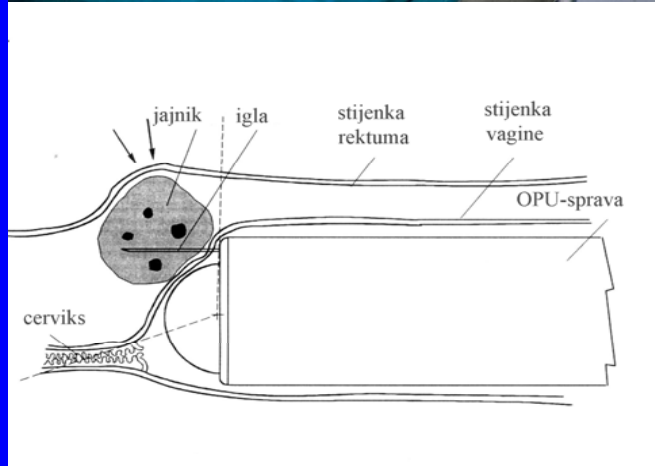
Stimulacija jajnika krava davateljica za OPU/IVF DF-/FSH skupina (n=8):



Transvaginalna ultrazvučna punkcija jajnika (OPU = ovum pick-up)



- **Oprema za OPU:**
- Ultrazvučni aparat sa sektorskom sondom (5/7,5 MHz)
- Uvađač igle za punkciju (Terumo 18 G)
- Vakuum pumpa



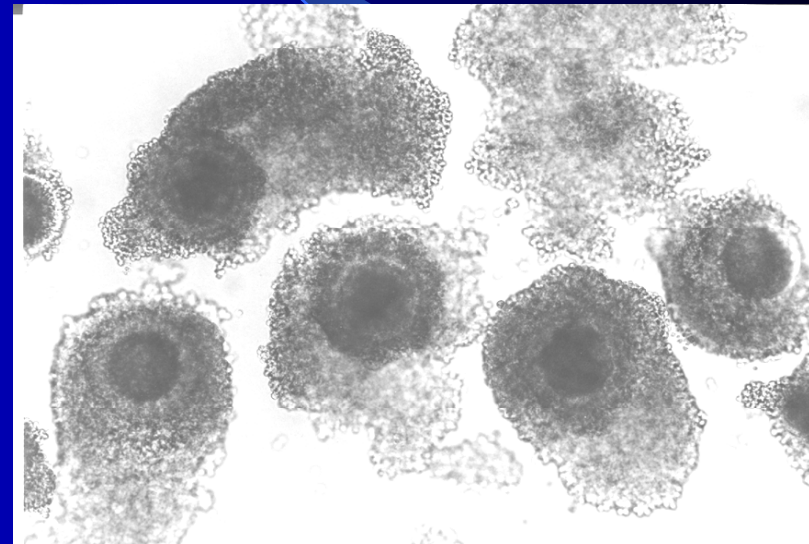
Shematski prikaz tehnike transvaginalne ultrazvučne punkcije jajnika.

B. Morfološka ocjena i kategorizacija jajčanih stanica

Najveći razvojni kapacitet za IVM/IVF/IVC postupak imaju jajčane stanice

- iz folikula >2 mm
- s homogenom ooplazmom
- potpuno okružene s više slojeva kompaktnih kumulusnih stanica

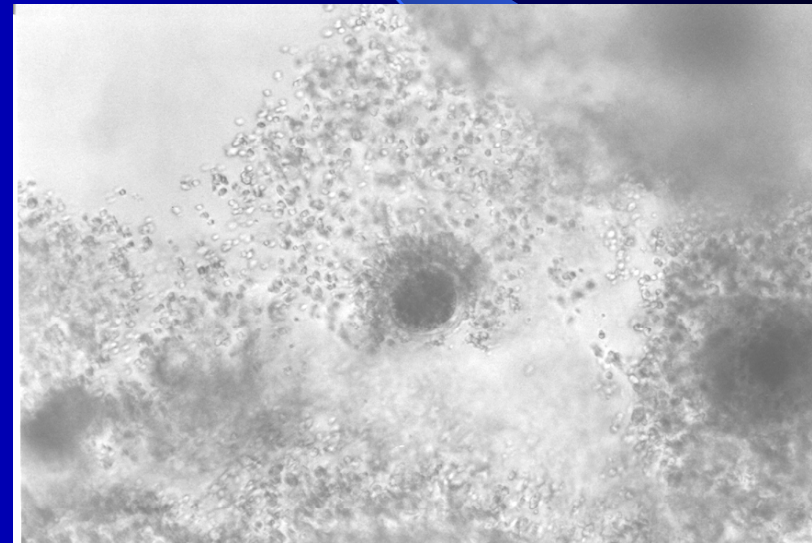
(Makek i sur, 1998.)



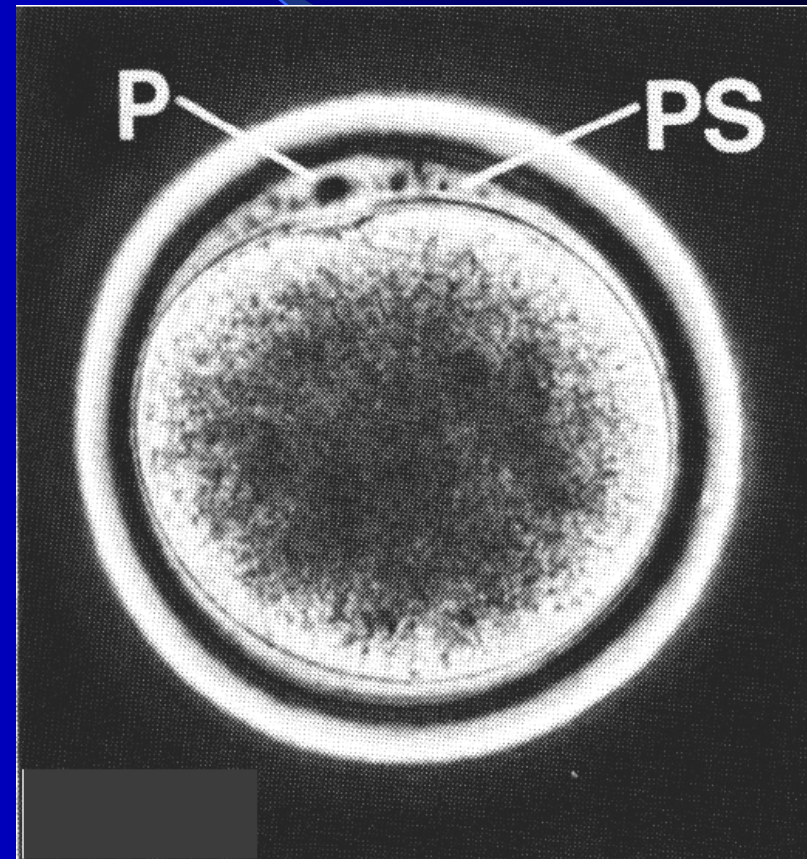
C. Dozrijevanje jajčanih stanica *in vitro* (IVM = in vitro maturacija)

TCM 199 (Tissue Culture Medium) uz dodatak fetalnog goveđeg seruma (FCS) ili seruma krava u estrusu (ECS) te gonadotropnih (FHS/LH) i/ili steroidnih hormona (E_2 , 17β).

Inkubacija: 24 sati, 39°C, 5% CO_2



Uspjeh maturacije mjeri se postotkom jajčanih stanica koje su dostigle **metafazu II (M II)** - izbačeno prvo polarno tjelešce (P) u perivitelinom prostoru (PS);
- prosječno iznosi 85% i više.



D. Oplodnja *in vitro* (IVF = in vitro fertilizacija)

METODE PRIPREME SJEMENA U IVF POSTUPKU:

- 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.)

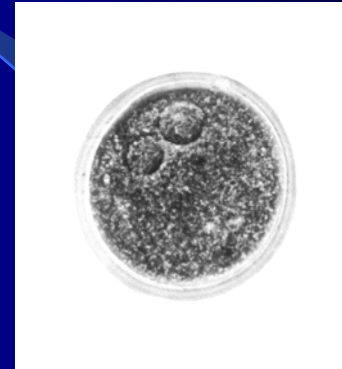
Koinkubacija jajnih stanica i spermija: 24 do 48 sati ovisno o metodi uzgoja na 39°C i 5% CO₂



ODREĐIVANJE USPJEHA OPLODNJE *IN VITRO* JAJČANIH STANICA GOVEDA

Nalaz muškog i ženskog
pronukleusa;

Nalaz zametaka koji su dostigli
razvoj od 4 i više stanica.



E. Uzgoj zametaka *in vitro* (IVC = in vitro kultura)

Oplođene jajčane stanice uzgajaju se *in vitro* do stadija **blastociste**, kada takvi zameci mogu biti presađeni u primateljice ili smrznuti i pohranjeni u tekućem dušiku.

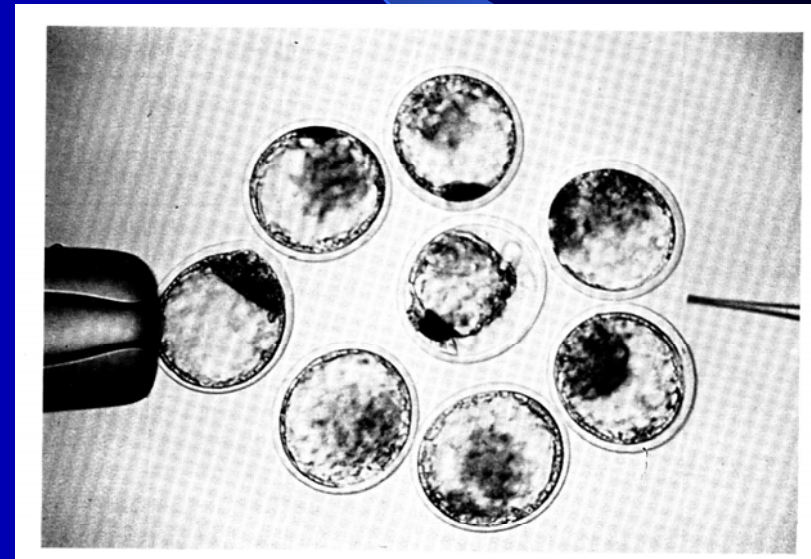
Primjenjuju se dvije metode uzgoja *in vitro*:

- ko-kultura zametaka s različitim somatskim stanicama: kumulusnim stanicama, epitelnim stanicama goveđeg jajovoda (BOEC = bovine oviduct epithelial cells), trofoblastičnim vezikulima;
- uzgoj u definiranim medijima (CZB, SOF, KSOM) - omogućuje bolju sanitarnu kontrolu, kao i bolju kontrolu uvjeta uzgoja.

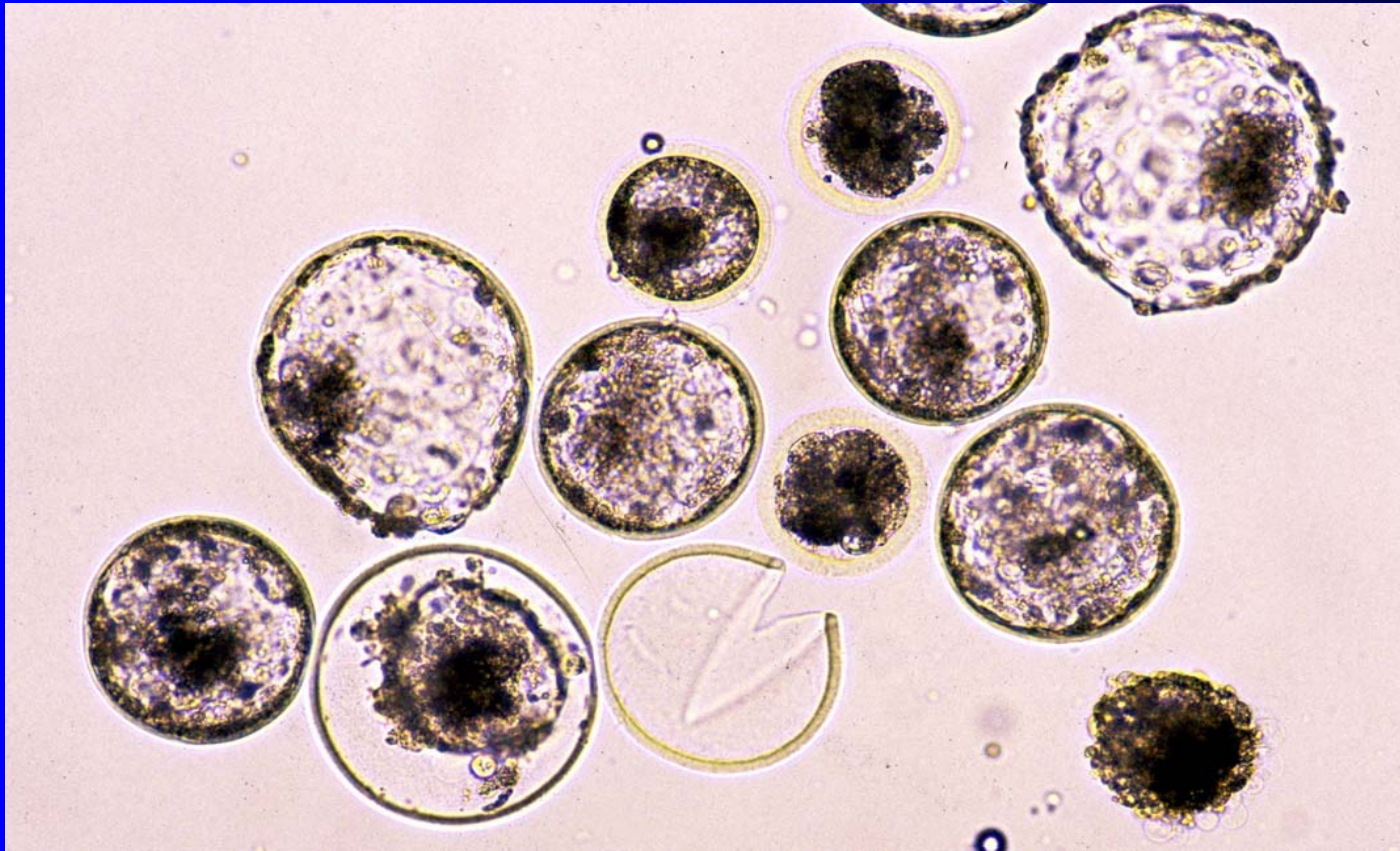
ODREĐIVANJE EMBRIONALNOG RAZVOJA I USPJEHA UZGOJA *IN VITRO* GOVEDIH ZAMETAKA

Učinkovitost metode uzgoja zametaka *in vitro* ocjenjuje se na osnovi:

- postotka morula i blastocista uzgojenih do 7-og dana;
- morfološkom ocjenom i kategorizacijom morula i blastocista (Priručnik IETS, 1998);
- određivanjem broja stanica zametka;
- ocjenom preživljavanja poslije dubokog smrzavanja zametaka;
- brojem oteljene IVP teladi.



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



IVP goveđih zametaka: mogućnosti primjene

(prema Van Soomu i de Kruifu, 1996)

EKONOMSKI ASPEKTI:

- transfer IVP zametaka teladi mesnih pasmina u primateljice mliječnih pasmina;
- dobivanje gameta od genetski elitnih životinja koje su postale jalove;
- OPU krava eminentnog pedigreea;
- korištenje jajčanih stanica juvenilnih životinja (značajno smanjene generacijskog intervala);
- sprječavanje prijenosa bolesti.

BIOTEHNOLOŠKE MOGUĆNOSTI:

- cijepanje zametaka
- kloniranje
- transgene životinje
- određivanje spola zametaka (PCR = Polymerase Chain Reaction)
- duboko smrzavanje IVP zametaka

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



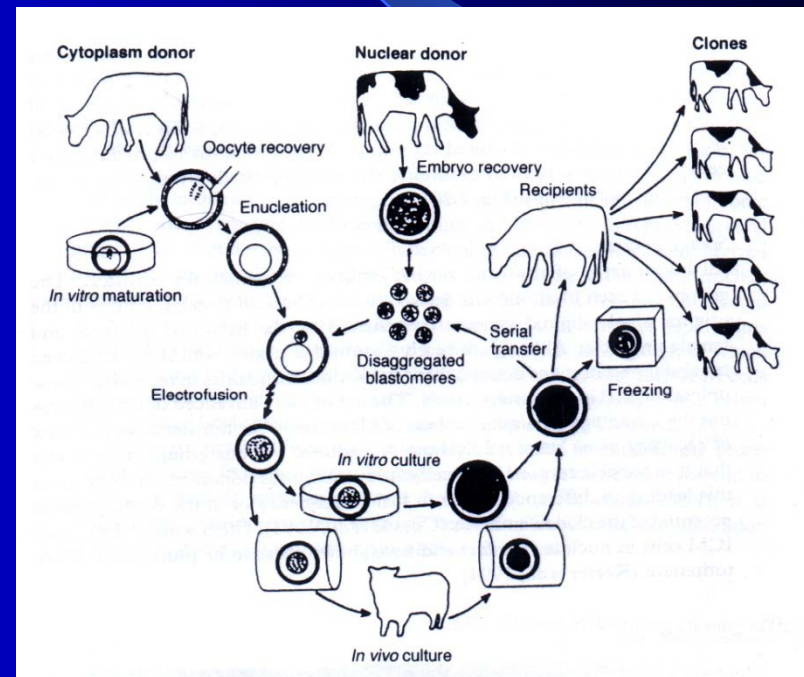
IV Generacija biotehnologije: Kloniranje i Transgeneza

- Mikromanipulacija zamecima
 - Cijepanje zametaka
 - Prijenos jezgre
 - Seksiranje sperme
 - Seksiranje zametaka

Kloniranje

Tehnika nuklearne transplantacije koja uključuje:

- E nukleaciju jajnih stanica (aspiracija polarnog tijela i dijela ooplazme)
- Transfer blastomera
- Fuziju stanice (elektrofuzija)
- Aktivaciju jajne stanice
- Predimplantacijski razvoj zametka in vitro i transfer.



Transgeneza

Uvođenje transgena u zametke prije implantacije pronuklearnim mikroubrizgavnjem s ciljem da se direktno djeluje na genetsku modifikaciju životinja.

Primjena:

- Ksenotransplantacija
- Proizvodnja životinja rezistentnih na određene bolesti
- Životinje posebnih proizvodnih svojstava (proizvodnja laktoalbumina, humanih rekombinantnih bjelančevina)

Seksiranje sperme protočnom citometrijom (Flow-cytometry)

Mjerenjem sadržaja DNA na osnovi intenziteta fluorescentne emisije nakon bojenja DNA-specifičnim fluorescentnim bojama:

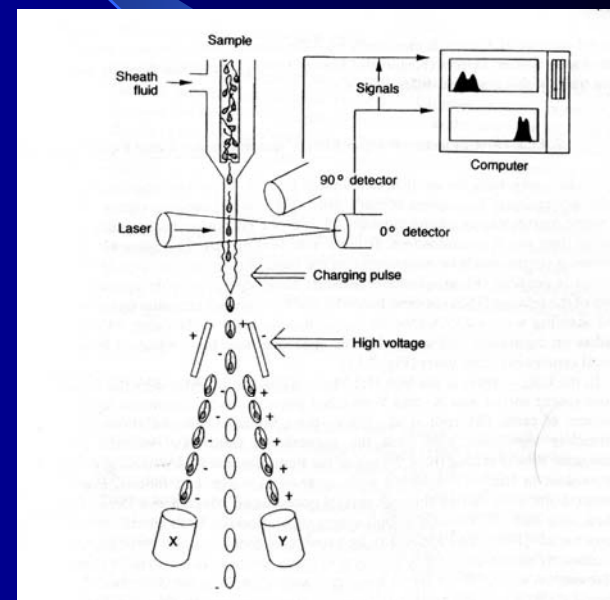
6×10^6 seksiranih spermija na sat

90% točnost

Primjena:

- umjetno osjemenjivanje
- in vitro oplodnja (IVF)
- Krioprezervacija
- ICSI (intracitoplazmatska injekcija spermija)

Cijena seksiranja: US\$ 30,00 po dozi od 6×10^6



EVOLUTION OF BOVINE ET/IVF ACTIVITY IN EUROPE

(S.Merton, AETE Proceedings)

Embryo production	Year 1997	Year 2000	Year 2005	Year 2008
<i>In vivo</i>	145 032	125 005	96 581	88 858
<i>In vitro</i>	11 443	26 520	18 597	7 832
Total	156 475	151 525	115 178	96 690
% of <i>in vitro</i>	7.3%			
Embryo transfer	Year 1997	Year 2000	Year 2005	Year 2008
In vivo	110 802	105 964	85 007	89 438
In vitro	7 748	13 803	5 816	5 601
Total	118 550	119 769	93 034	101 149
% Of <i>in vitro</i>	6.5%	11.52%	6.3%	5.5%
% of frozen Transfer	53%	55%	56.8%	56.4%

EMBROTRANSFER ACTIVITIES IN OTHER SPECIES IN EUROPE (S. Merton, AETE Proceedings)

Embryo production	Year 1999	Year 2000	Year 2005	Year 2008
Sheep	6 744	847	83	419
Swine	3 995	816	271	736
Goat	303	243	160	83
Horse	222	563	509	1043
Embryo transfer				
Sheep	6 330	440	61	375
Swine	534	619	192	28
Goat	176	145	76	75
Horse	194	226	711 (47 IVP)	1014 (48 IVP)

Laboratorij za asistiranu reprodukciju



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
VETERINARSKI FAKULTET U ZAGREBU

