

**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

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.

Čimbenici koji utječu na uspjeh U.O.:

1. Otkrivanje estrusa
2. Vrijeme osjemenjivanja
3. Reproktivno zdravlje plotkinja
4. Kontrola i rana indukcija estrusa nakon telenja
5. Kvaliteta sperme (plodnost bikova, način čuvanja i otapanja DS sperme)
6. Tehnika osjemenjivanja

1. Otkrivanje estrusa - kritične točke:

- varijacije u dužini spolnog ciklusa (od 18 do 24 dana)
- varijacije u dužini trajanja estrusa (od 4 do 24 sata)
- znakovi estrusa - prepoznavanje od strane stočara
- individualne razlike
- sputanost životinja (držanje na vezu)
- tiho gonjenje

1. Otkrivanje estrusa:

- Znakovi estrusa
- Promatranje **3 puta dnevno po 20 min**
- ledni markeri, boja za rep, vazektomirani bikovi probači, pedometri i dr.

| metoda otkrivanja | učestalost | % uspješnog otkrivanja |
|-------------------|------------|------------------------|
| bik probač | 2 x / dan | 80 - 90 |
| | 3 x / dan | 88 - 100 |
| promatranje | 2 x / dan | 65 - 75 |
| | 3 x / dan | 70 - 80 |

2. Vrijeme osjemenjivanja: A.M./P.M.

- Ovulacija: 10 do 15 sati nakon završetka gonjenja
- Kapacitacija spermija

Optimalno vrijeme inseminacije u odnosu na trajanje estrusa:

| Plodnost | loša | dovoljna | d o b r a / i z v r s n a | | | dovoljna | loša |
|--------------------------------|------|----------|----------------------------------|----|----|----------|------|
| Sati | 0 | 5 | 10 | 15 | 20 | 25 | 30 |
| ← pasivni refleks opasivanja → | | | | | | | |

3. Reproduktivno zdravlje plotkinja:

↑ mlječnost ↔ plodnost ↓

- hranidba, držanje
- produženi estrusi, zakašnjela ovulacija, folikularna atrezija
- kontrola estrusa i indukcija ovulacije (GnRH, Ovsynch/TAI)

4. Kontrola i indukcija estrusa - razlozi:

- indukcija u mlječnih krava kod kojih nije primijećen estrus do 45. dana p.p.
- sinkronizacija junica za U.O. sa sjemenom bikova koji daju nešto lakšu telad
- lakše otkrivanje estrusa i smanjenje vremena potrebnog za otkrivanje estrusa
- bolja kontrola razdoblja telenja u stadu
- indukcija estrusa i ovulacije u krava s p.p. anestrijom

4. Metode kontrole estrusa:

U krava i junica s aktivnim jajnicima:

- $\text{PGF2}\alpha$ - indukcija ranije regresije C.L.
(između 6. i 16. dana ciklusa)
- $\text{PGF2}\alpha$ i GnRH – sinkronizirani rast folikula nakon inducirane luteolize
- Upotreba progestagena koji djeluju kao umjetno žuto tijelo

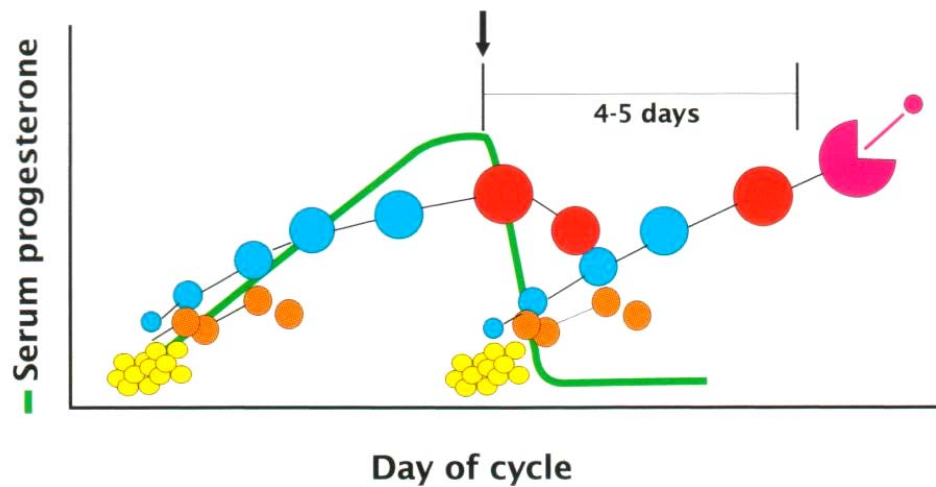
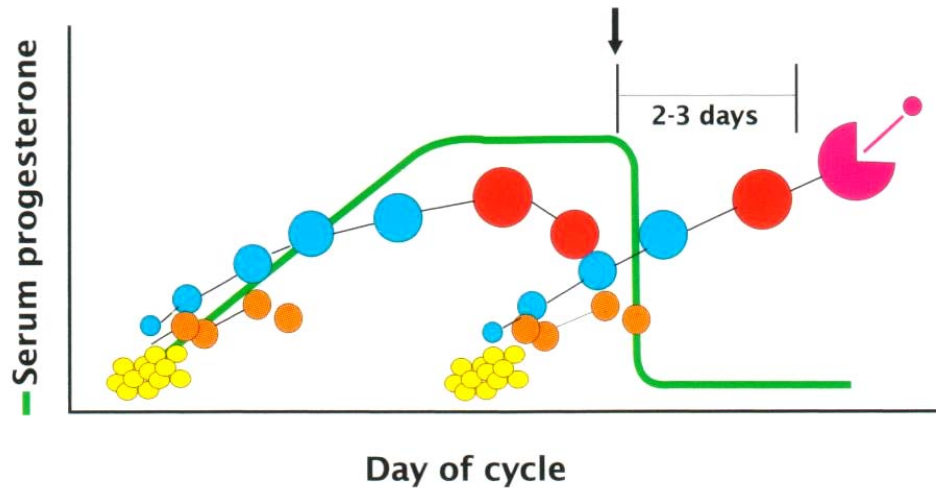
PROSTAGLANDINI

- PGF2 α - jednokratna primjena uz prethodnu rektalnu pretragu ili utvrđivanje koncentracije P4 (funkcionalno C.L.)
- Dvije injekcije PGF2 α u razmaku od 11 do 13 dana

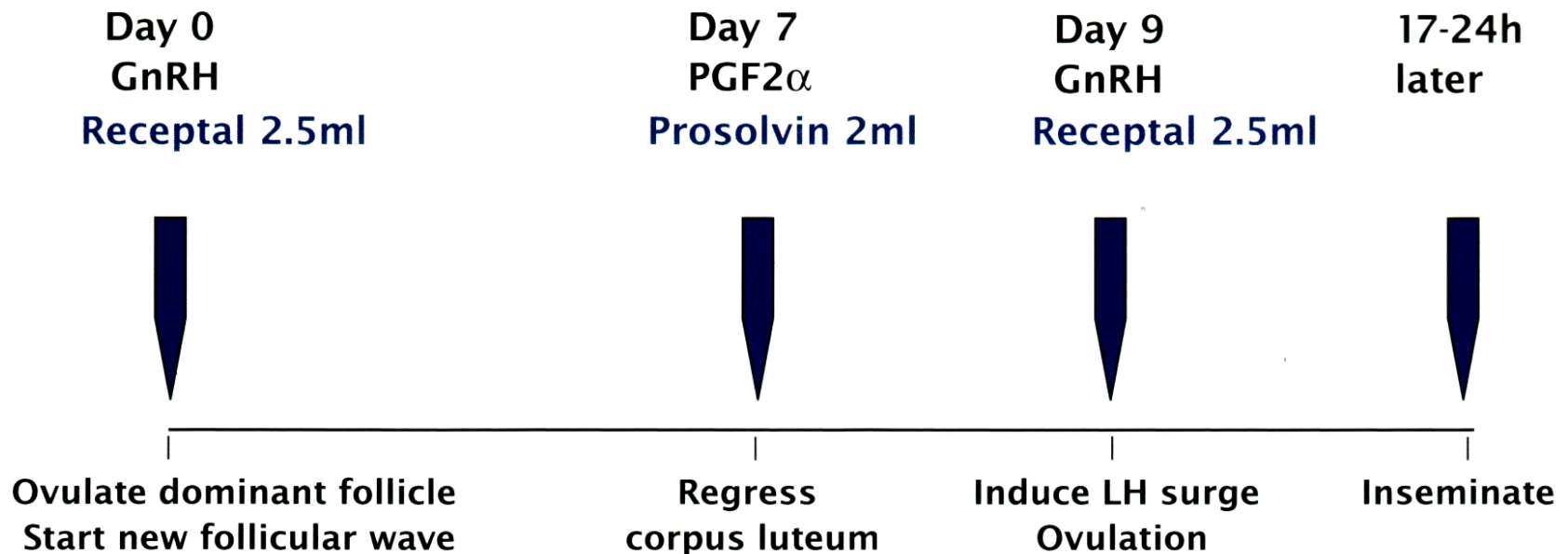
U.O. u primjećenom estrusu – mlječne krave

U.O. dvokratno 72 i 96 sati nakon 2. injekcije PGF2 α ili jednokratno 80 sati nakon 2. injekcije PGF2 α

Odgovor na injekciju $\text{PGF2}\alpha$ ovisi o folikularnoj dinamici tijekom spolnog ciklusa.



Prostaglandini + GnRh analozi (Ovsynch / TAI metoda)



Progestageni

Indukcija estrusa: kod plotkinja u ciklusu
kod acikličnih krava p.p.

Tretman u trajanju od 10 do 12 dana.

- umjetno žuto tijelo → blokada oslobađanja gonadotropina
- senzibilizacija hipotalamo-hipofizarne-jajničke veze nakon prestanka davanja egzogenog progesterona ili progestagena (rebound efect)
- razvoj folikula → ESTRUS

Progestageni

Regresiju C.L. osigurava kombinacija progestagena s luteolitičkim faktorima:

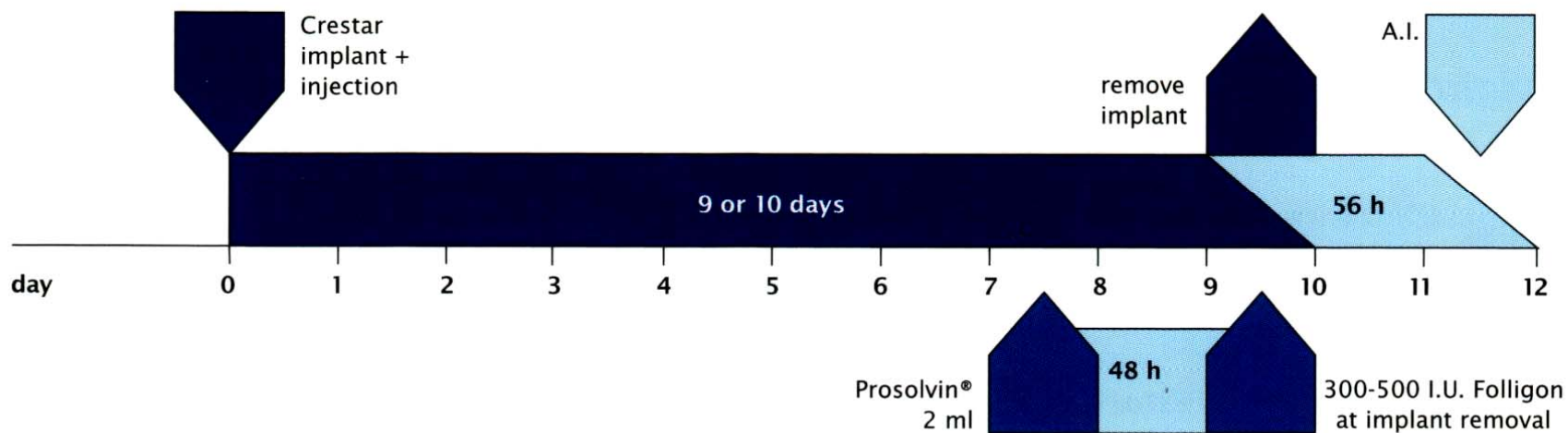
- Aplikacija ESTROGENA na početku tretmana
- Aplikacija PGF2 α na kraju tretmana

Progestageni

Primjena:

1. Oralna: MGA (melengestrol acetat)
2. Parenteralna
3. Lokalna:
 - intravaginalne PRID (Progesterone Releasing intravaginal device) spirale
 - CIDR (Controlled internal drug release device) umeci
 - subkutani implantati (norgestomet + estradiol)

Indukcija estrusa pomoću Crestara® kod mlječnih krava



Kvaliteta sperme i tehnika osjemenjivanja

- Redovno punjenje kontejnera, odmrzavanje DS sjemena i priprema pistoleta neposredno prije U.O.

Obavezna rektalna pretraga!!!

- **Duboko cervikalno ili intrakorporalno osjemenjivanje**

Biotehnološka metoda II. generacije EMBRIOTRANSFER (MOET)

- Širenje genoma najkvalitetnih plotkinja
- Zamrzavanje zametaka
- Trgovina zamecima, uvoz genetike
- Sprečavanje širenja zaraznih bolesti
- Bližnjenje
- Dobivanje potomstva od sekundarno jalovih krava
- Očuvanje genetskog fonda, te ugroženih vrsta
- Nukleus stada

Biotehnološka metoda II. generacije EMBRIOTRANSFER

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

Izbor krava davateljica u MOET postupku

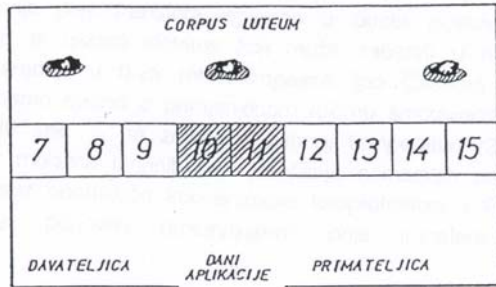
- **Krave pod selekcijom (uzgojna vrijednost)** – voditi računa o proizvodnim rezultatima davateljice i njezinih potomaka (% odbijene teladi, mlječnost, prirast potomaka, eksterijer)
- **Reprodukcijaska vrijednost:** krave u najboljoj reprodukcijskoj dobi (od 3 do 8 godina) s visokim stupnjem prodnosti (normalno telenje svake godine, redovni ciklus, bez teškog poroda i problema u puerperiju, zdravi spolni organi, zdravo vime)

Izbor krava primateljica u MOET postupku

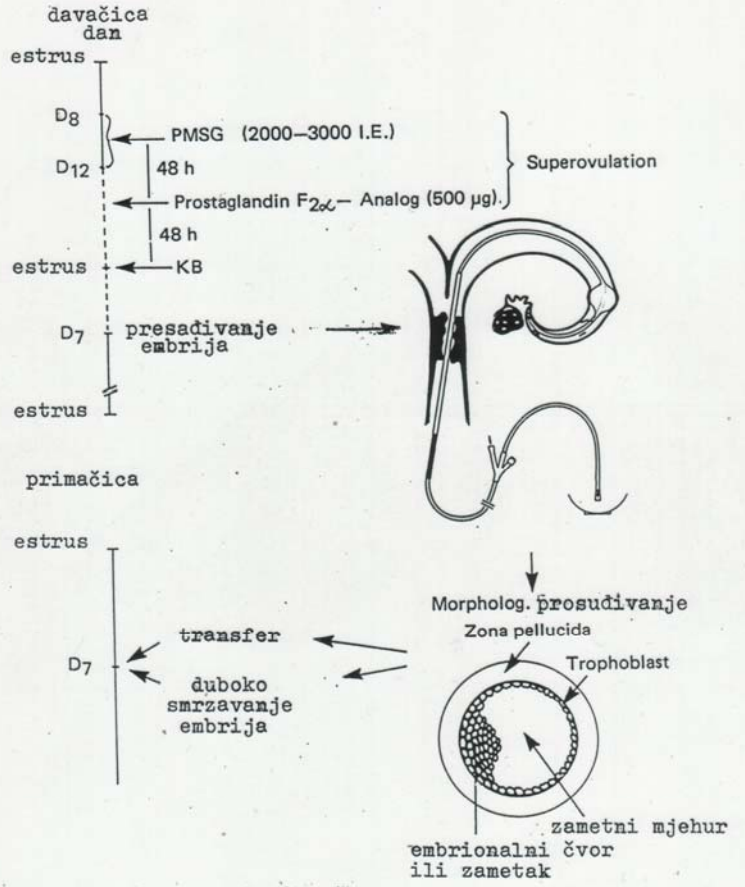
- 1 davateljica : 7 primateljica, odnosno 2 : 10 (direktni ET)
- Junice ili mlade krave s besprijekornom plodnošću, koje ne moraju biti uzgojno vrijedne, ali:
 - dobrog zdravlja i kondicije
 - zdravih spolnih organa (pratiti najmanje 1 spolni ciklus)
 - dobre mlječnosti
 - moraju koncipirati brzo i lagano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

Superovulacija davateljica

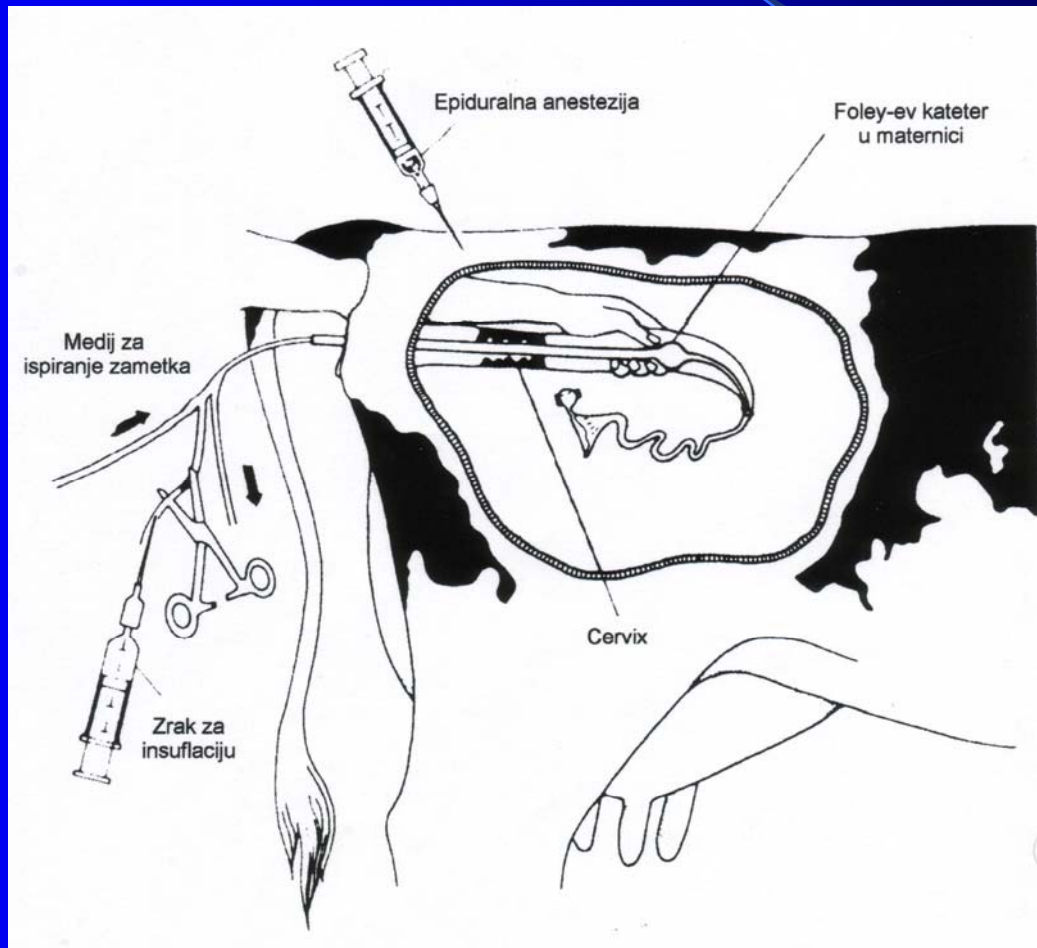
- PMSG preparati (Folligon[®]) – jednokratna primjena uz aplikaciju PGF2 α nakon 48 sati
- FSH preparati (Folltropin[®], SuperOv[®], Stimufol[®], Ovagen[®] i dr.) – dva puta dnevno tijekom 4 dana uz aplikaciju PGF2 α 48 sati nakon prve aplikacije FSH
- U.O. – višekratno u induciranom estrusu



| DAVATELJICA | DANI APLIKACIJE | PRIMATELJICA |
|---|----------------------|-------------------|
| PREGLED SPOLNIH ORGANA NA ŽUTO TIJELO 10 DAN CIKLUSA | | |
| UJUTRO FSH | POSLIJE PODNE FSH | |
| FSH | FSH | |
| FSH | PGF _{2L} | PGF _{2L} |
| FSH | FSH | |
| 6 ili 0 | | |
| u.o. 1 DOZA | ESTRUS | u.o. 1 DOZA |
| u.o. 1 DOZA | ESTRUS | u.o. 1 DOZA |
| DANI CIKLUSA | | |
| DAVAT I PRIMAT. NE HRANITI 24h I NE POJITI 12h PRIJE ISPIRANJA DAVAT. | | |
| SAKUPLJANJE EMBRIJA | | |
| TRANSFER EMBRIJA | | |



Ispiranje davateljica u ET postupku



EMBRIOTRANSFER

- Superovulacija: 10 do 20 C.L.
- 5 do 6 zametaka/kravi davateljici po ispiranju
- Postotak bređosti nakon transfera svježih zametaka iznosi 61%, a zamrznutih 50 do 60%
- Međunarodni promet zametaka iznosi oko 30.000 godišnje.
- Superovulacija davateljica - glavni ograničavajući čimbenik

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

EVOLUTION OF BOVINE ET ACTIVITY IN EUROPE

(Y. HEYMAN, AETE Lyon, 2001)

| Embryo production | Year 1997 | Year 1998 | Year 1999 | Year 2000 |
|----------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| <i>In vivo</i> | 145032 | 141842 | 145305 | 125005 |
| <i>In vitro</i> | 11443 | 23458 | 25146 | 26520 |
| Total | 156475 | 165300 | 170451 | 151525 |
| % of <i>in vitro</i> | 7.3% | 14.2% | 14.7% | |
| Embryo transfer | Year 1997 | Year 1998 | Year 1999 | Year 2000 |
| In vivo | 110802 | 120361 | 129779 | 105964 |
| In vitro | 7748 | 14153 | 13389 | 13803 |
| Total | 118550 | 134514 | 143168 | 119769 |
| % Of in vitro | 6.5% | 10.6% | 9.13% | 11.52% |
| % of frozen Transfer | 53% | 51% | 58% | 55% |

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 (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;

OPU / IVF

24 plotkinja simentalске pasmine:

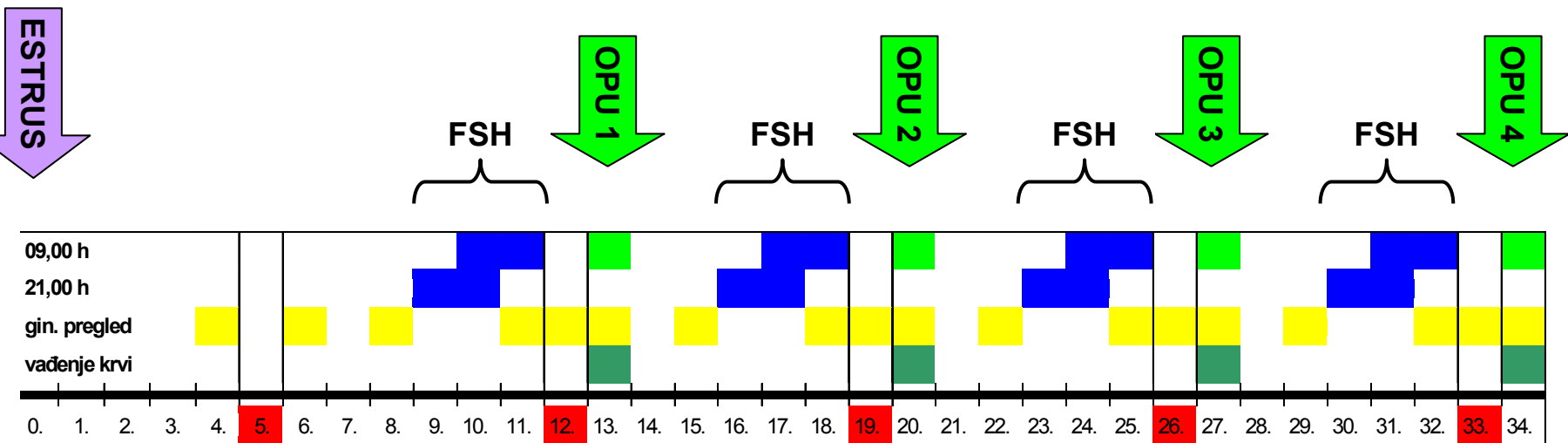
- 8 junica u dobi od 16 do 24 mjeseca
- 16 krava u dobi od 2,5 do 6 godina

Sinkronizirane i podijeljene u 3 grupe:

1. FSH stimulirane davateljice (**FSH skupina**);
2. FSH stimulirane nakon aspiracije DF (**DF-/FSH skupina**);
3. **kontrolna skupina** nestimuliranih krava.

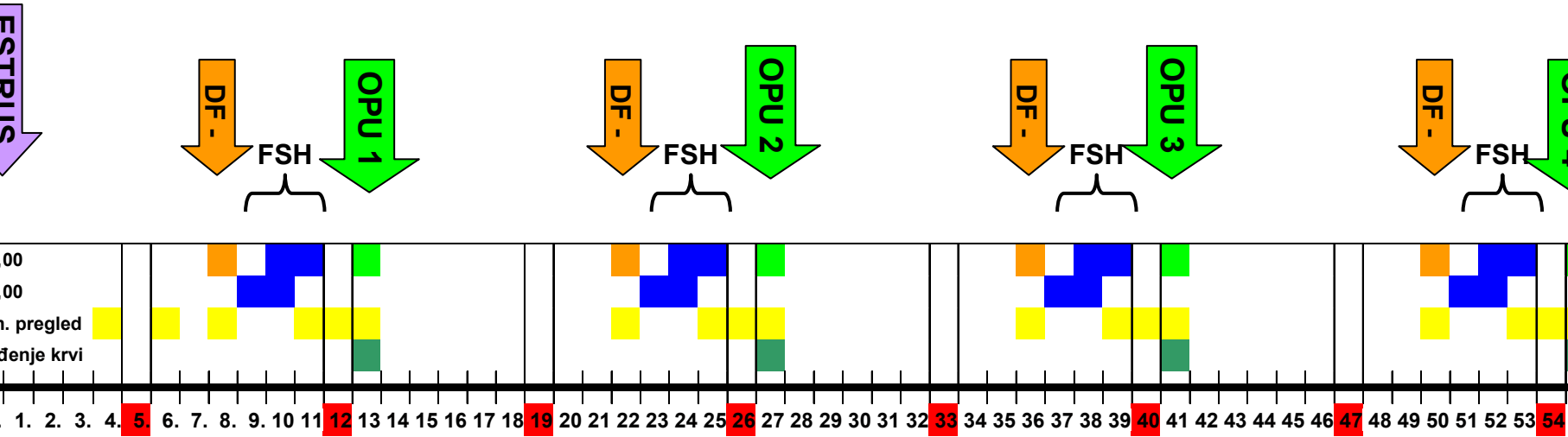
OPU /IVF

Postupak stimulacije jajnika u **FSH skupini**
davateljica za OPU/IVF (n=8):



MATERIJAL I METODE

Postupak stimulacije jajnika u DF-/FSH skupini davateljica za OPU/IVF (n=8):



OPU / IVF

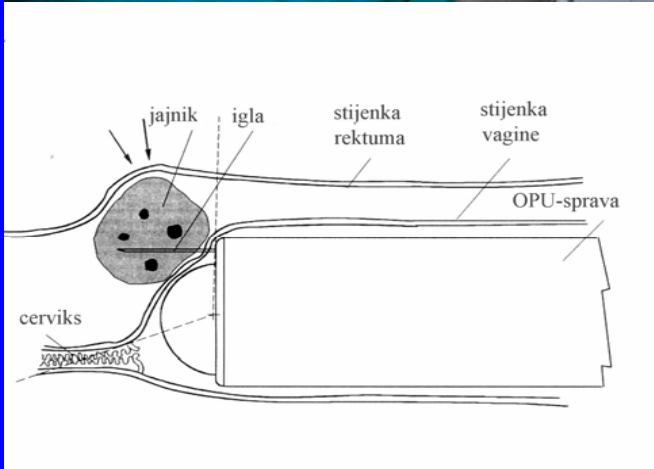
Kontrolna skupina nestimuliranih krava (n=8):

- OPU 2 puta tjedno u razmacima od 3 ili 4 dana, u razdoblju od mjesec dana
- Prva aspiracija: 3. ili 4. dana ciklusa.
- Ukupno 8 aspiracija po svakoj davateljici;

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.

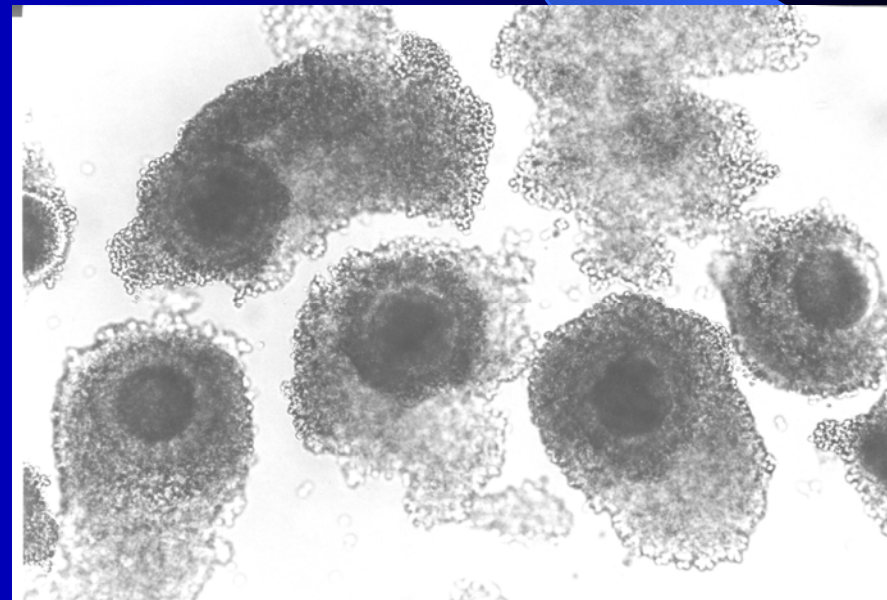
Morfološka ocjena i kategorizacija jajčanih stanica

Za IVM/IVF/IVC:

- Potpuno ili djelomično okružene kompaktnim slojem kumulusnih stanica (G1+G2);
- Nepotpuni kumulusni omotač i neravnomjerno granulirana ooplazma (G3);

Za van:

- "Gole" jajne stanice (G4), s degeneriranim ooplazmom;
- **Ekspandirane** jajne stanice.



MATERIJAL I METODE

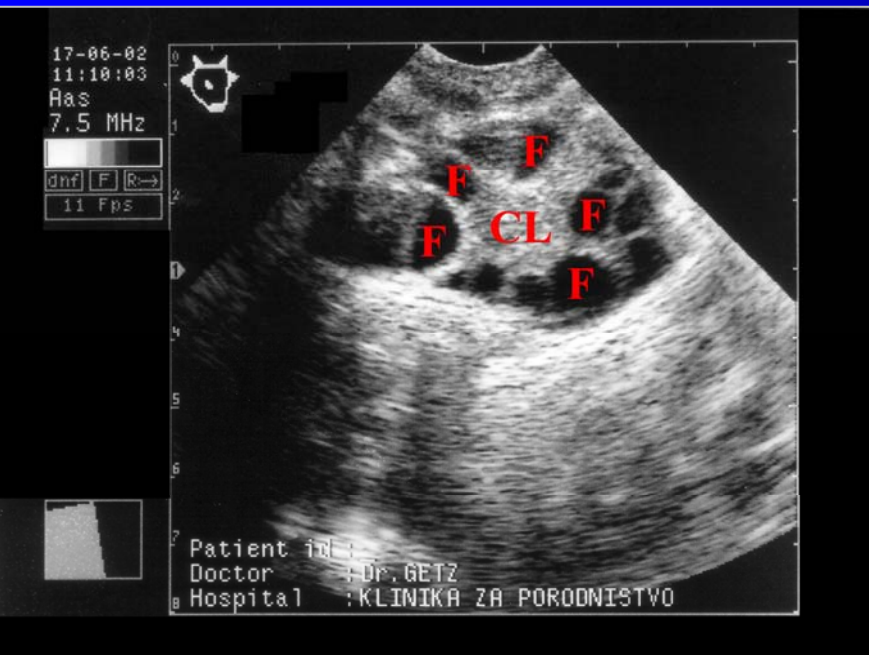
IVM/IVF/IVC

- **IVM:** TCM199 s 10% FCS, FSH/LH, estradiola i cisteamina.
Inkubacija: 24^h na 39°C i 5% CO₂
- **IVF:** DS sperma bika centrifugirana na gradijentu Percolla
Konačna koncentracija za IVF: 10⁶ spermija/ml
- **Uzgoj u definiranom SOFaaBSA mediju.**
Inkubacija: na 39°C
s 5% CO₂, 7% O₂ i 88% N₂

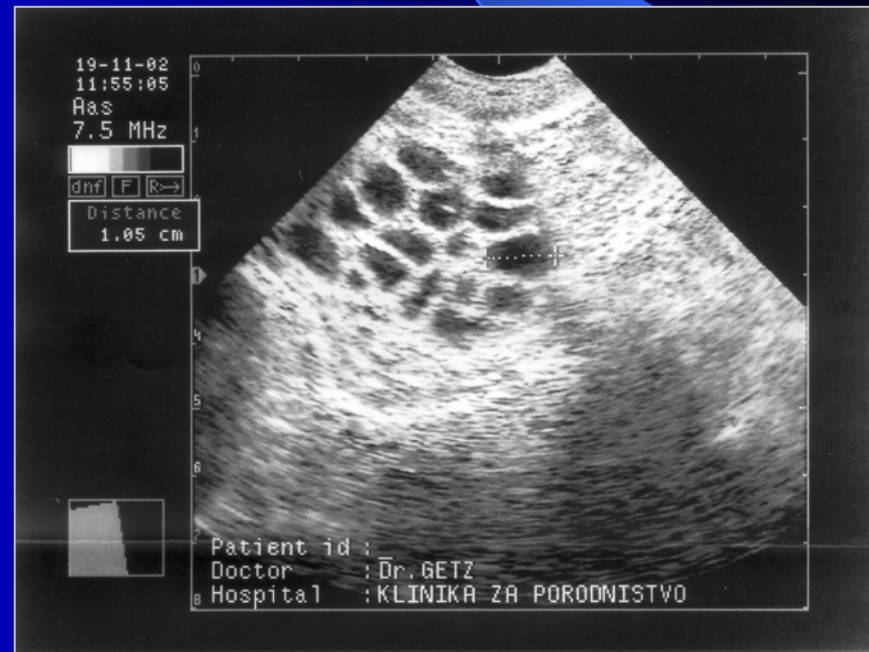


REZULTATI

Jajnik krave davateljice u FSH skupini, 48 sati nakon zadnje FSH injekcije. Vidi se 5 folikula promjera 6 do 9 mm (F), nekoliko manjih te centralno smješteno žuto tijelo (CL).



Jajnik krave davateljice u DF-/FSH skupini, 48 sati nakon zadnje FSH injekcije.



REZULTATI

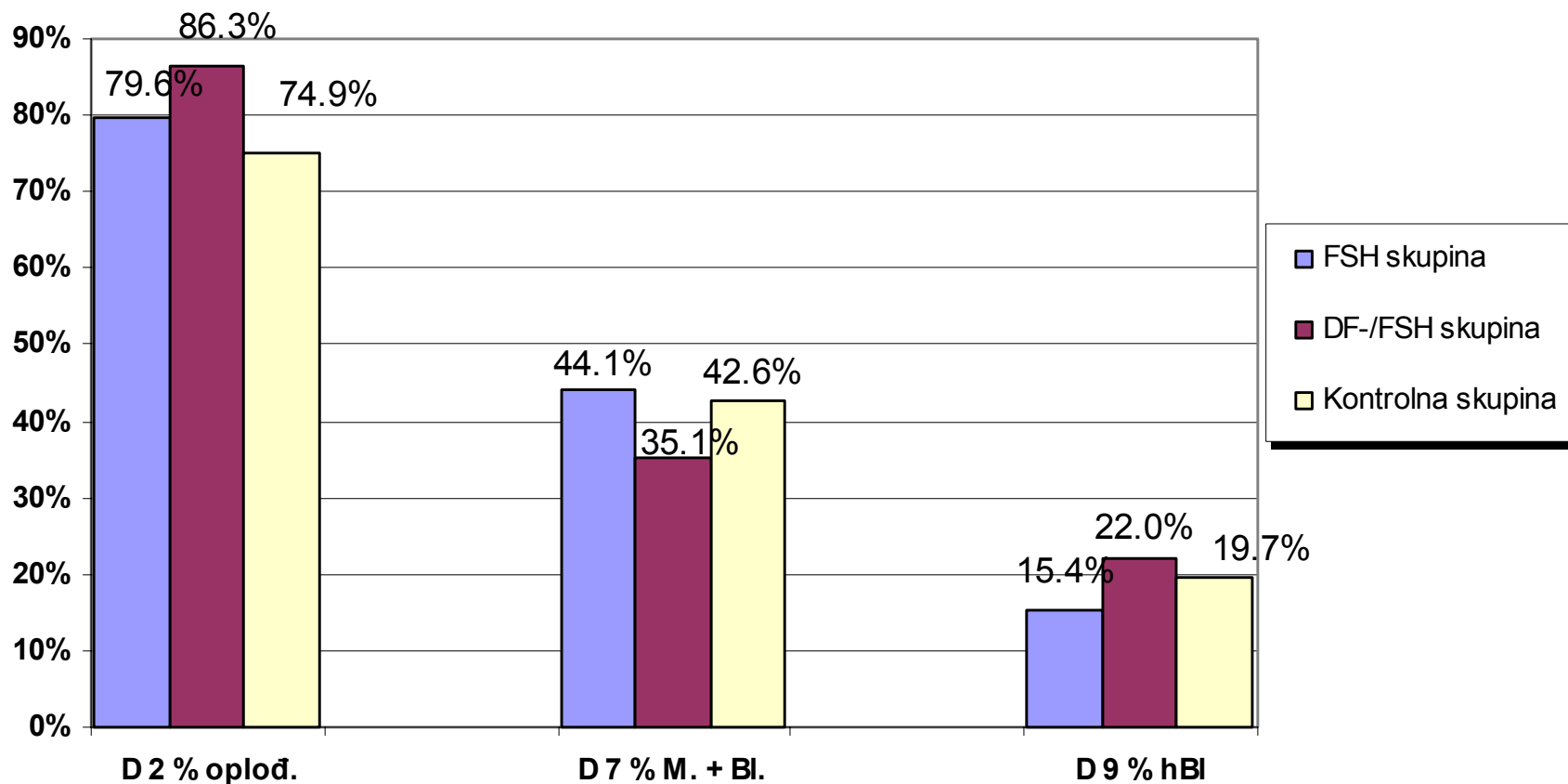
Kategorizacija aspiriranih govedih jajnih stanica kod stimuliranih i nestimuliranih davateljica.

| | broj aspirir. jajnih stan. | G1 + G2 | G3 | G4 | ekspandirane jajne stanice | br.j.stanica u IVM |
|--|----------------------------|-----------|-----------|-----------|----------------------------|--------------------|
| FSH-skupina (n=32) (S.V.±SEM) | 8,03±0,7* | 5,09 ±0,7 | 1,21 ±0,3 | 0,37 ±0,1 | 1,34 ± 0,2* | 6,31 ±0,7* |
| VAR. | 17,64 | 15,76 | 3,01 | 0,50 | 1,58 | 18,22 |
| S.D. | 4,20 | 3,97 | 1,73 | 0,70 | 1,26 | 4,26 |
| DF-/FSH-skupina (n=32) (S.V.±SEM) | 7,59±0,6* | 4,84 ±0,6 | 0,87 ±0,2 | 0,40 ±0,1 | 1,46 ± 0,3* | 5,71 ±0,6* |
| VAR. | 13,79 | 11,10 | 1,08 | 0,57 | 4,32 | 12,40 |
| S.D. | 3,71 | 3,33 | 1,04 | 0,75 | 2,07 | 3,52 |
| u ciklusu (kontrola) (n=32) (S.V.±SEM) | 4,68 ± 0,5 | 3,28 ±0,4 | 0,84 ±0,2 | 0,53 ±0,1 | 0,03 ± 0,03 | 4,12 ±0,4 |
| VAR. | 6,93 | 5,17 | 0,97 | 0,64 | 0,03 | 5,72 |
| S.D. | 2,63 | 2,27 | 0,98 | 0,80 | 0,17 | 2,39 |

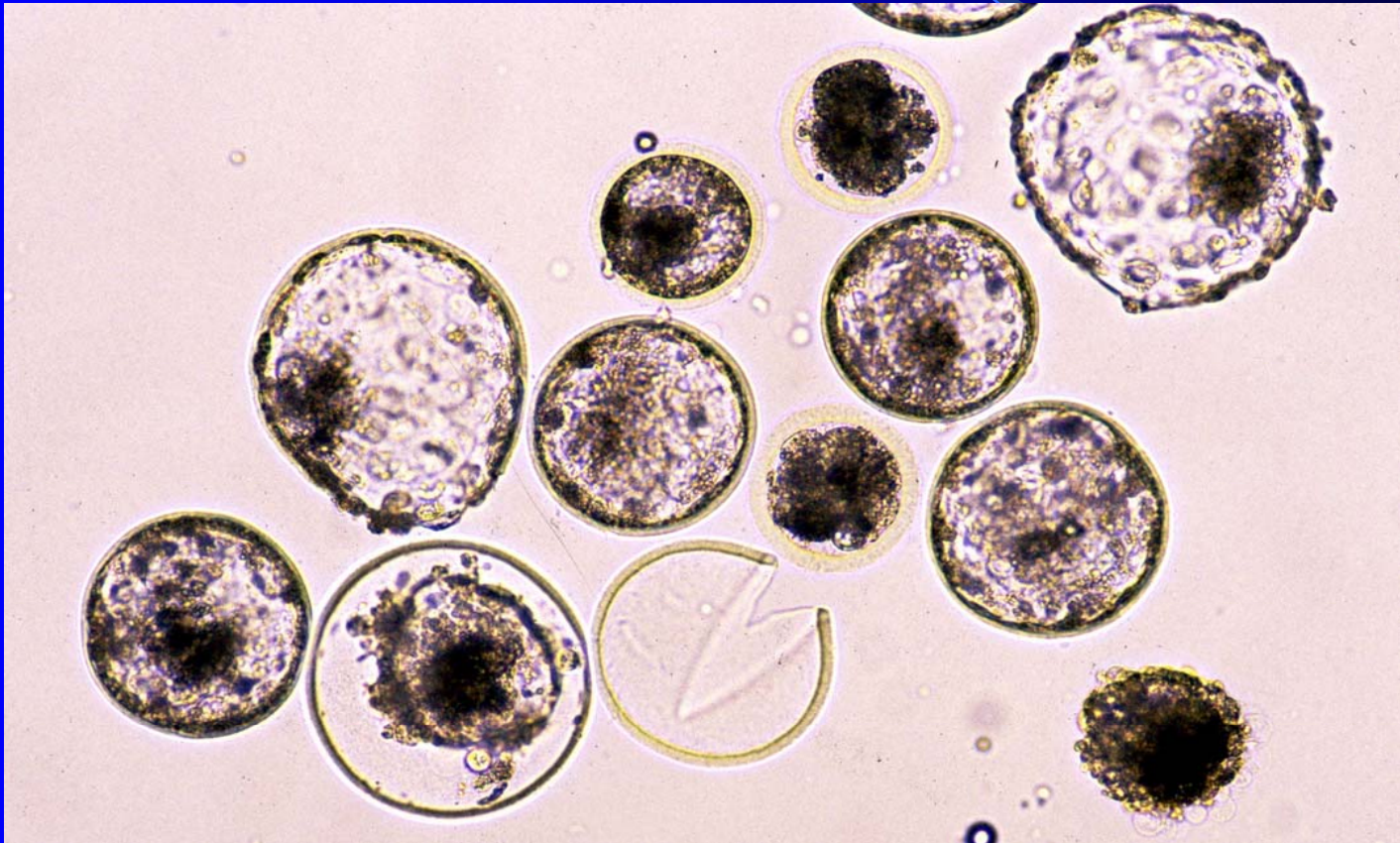
* P<0,05

REZULTATI

Oplodnja i uzgoj *in vitro* govedih jajnih stanica porijeklom od stimuliranih i nestimuliranih davateljica.



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



Mogućnosti primjene OPU tehnike:

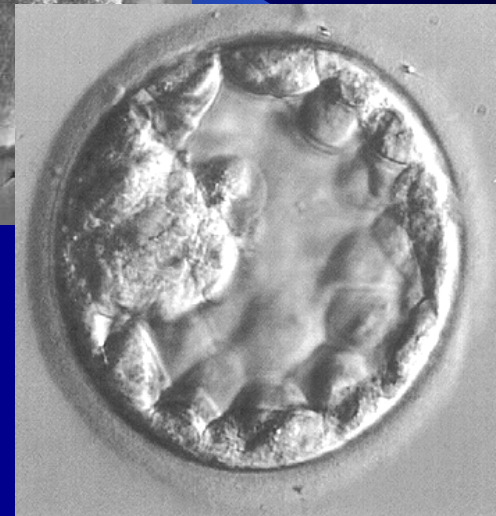
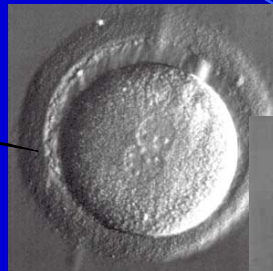
- Alternativa klasičnom MOET-u (do 100 zametaka godišnje po davateljici)
- Više teladi od iste davateljice i različitih bikova (smanjivanje inbreedinga)
- Jajne stanice gravidnih junica i krava te krava u puerperiju
- Dobivanje potomstva od sekundarno jalovih, genetski vrijednih plotkinja
- Jajne stanice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



ZAKLJUČAK

- Primjena navedenih biotehnoloških metoda nužna je za uključivanje naše stočarske proizvodnje u međunarodne tijekove.
- Republika Hrvatska ima kvalitetan stočni fond i još uvijek uživa status zemlje slobodne od danas najopasnijih stočnih zaraza, što je prednost koju svakako moramo iskoristiti.
- Formiranjem matičnih stada domaćeg simentalskog goveda te korištenjem poželjnog genoma za proizvodnju mesa i mlijeka izravno se potiče širenje boljih proizvodnih svojstava životinja naše populacije čime ostaje očuvan status zdravog proizvoda.

Laboratorij za asistiranu reprodukciju



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
VETERINARSKI FAKULTET U ZAGREBU

