

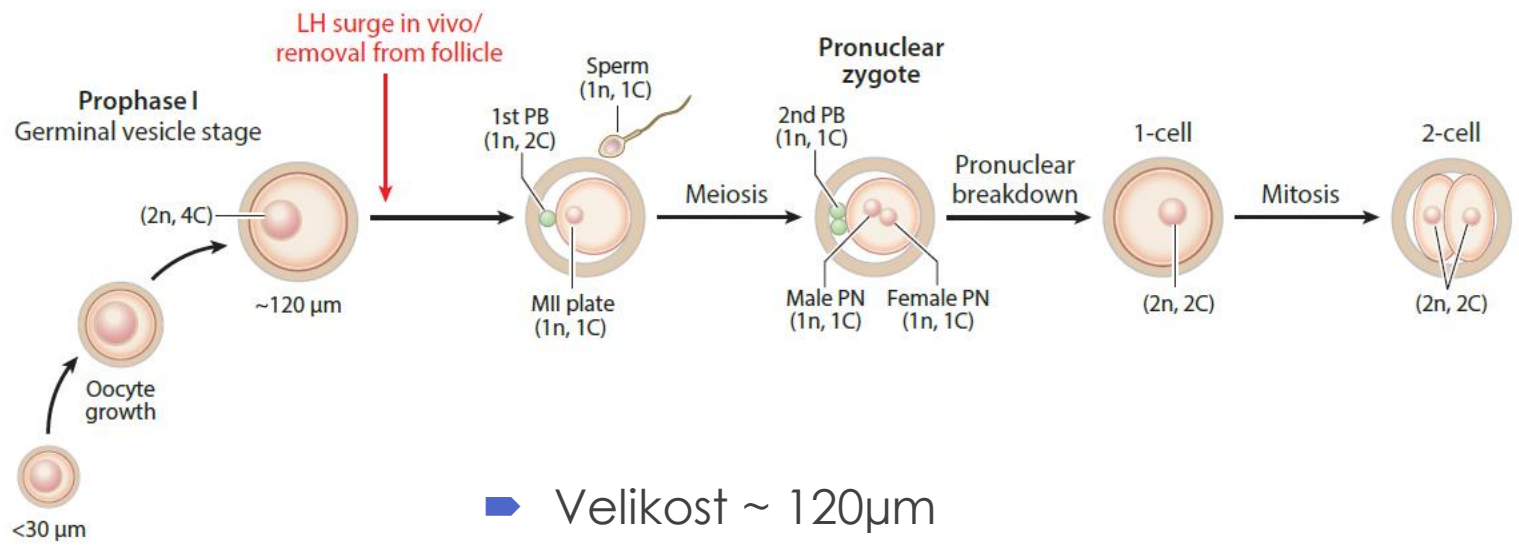
Hodnocení kvality oocytů skotu získaných aspirací ovariálních folikulů

Ing. Veronika Kinterová, Ph.D.

Ústav živočišné fyziologie a genetiky AV ČR, v. v. i. Liběchov

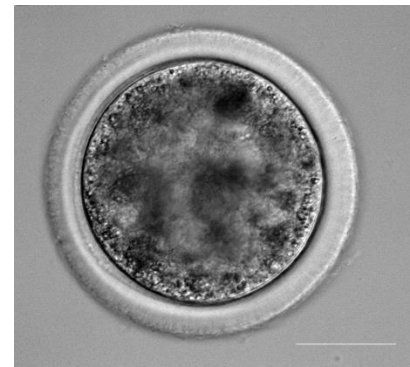


Prezentované výsledky jsou součástí projektu **QK22010270**, který je řešen s finanční podporou Ministerstva zemědělství, Národní agentury pro zemědělský výzkum

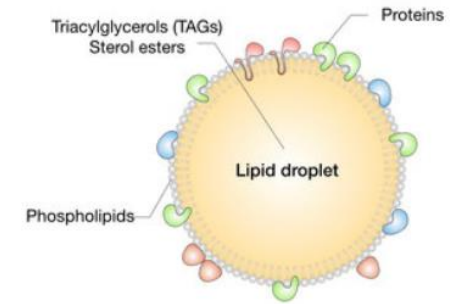


Oocyty skotu

- ▶ Velikost $\sim 120 \mu\text{m}$
- ▶ Oocyt – obklopený kumulárními buňkami (CC) – přísun metabolitů a nutrientů – důležité k rozpadu zárodečného váčku (GVBD) a vývoj do metafáze II (MII)
- ▶ Kvalitní oocyt – neporušená ZP, sférický tvar, homogenní cytoplazma
 - ▶ po maturaci – přítomnost pólového tělíska, meiotického vřeténka
- ▶ Meiotické zrání a fertilizace – procesy náročné na energii – při IVM - nárůst počtu lipidových dropletů (Aardema et al. 2011)

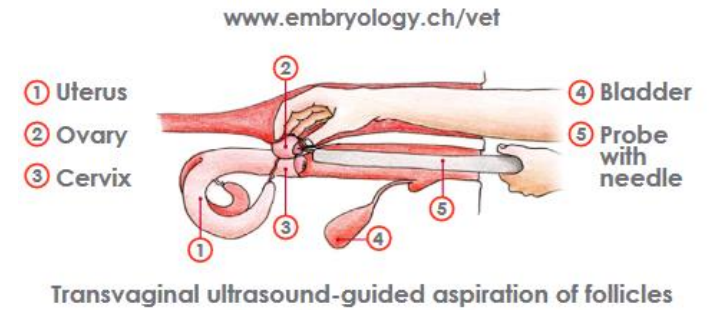


Lipidy



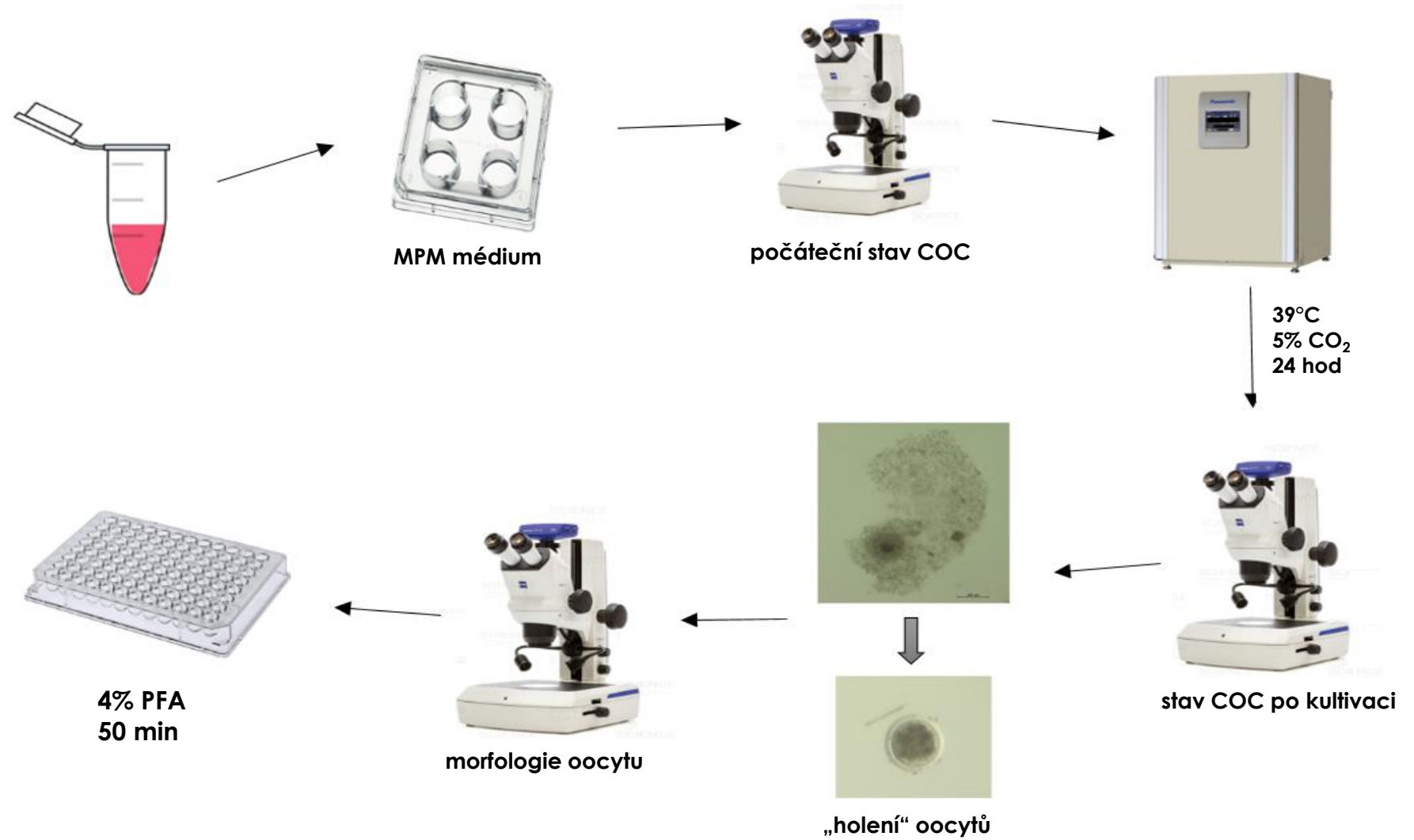
- ▶ Důležitý zdroj energie (u skotu a prasete převažuje nad oxidací pyruvátu)
- ▶ Volné mastné kys. pomocí krevního séra → folikulární tekutina → CC → oocyt
- ▶ Lipidy v oocytu ve formě lipidových dropletů/kapiček (LD)
- ▶ LD vznikají v endoplasmatickém retikulu – skladování energetických substrátů
- ▶ Tmavší cytoplazma = více LD = vyšší vývojová kompetence (Jeong et al., 2009)
- ▶ Větší LD s vyšším embryonálním stádiem – vznikají růstem nebo spojováním
- ▶ LD- Oocyty dojnic > oocyty jalovic (závislé na energetické bilanci, stravě a konstituci)

Ovum pick up (OPU)



- ▶ Prvotelky bez hormonální stimulace - 55 – 75 dnů po otelení
- ▶ Současné hodnocení metabolického a oxidativního statusu
- ▶ Ultrasonografické vyšetření – výskyt folikulů a CL – aspirace folikulů > 2 mm
- ▶ Odběr přes poševní stěnu – podtlaková pumpa
- ▶ Převoz v nahřátém „holding“ médiu

OPU oocyty → *in vitro* maturace (ÚŽFG)



Hodnocení kvality oocytů

Vizuální hodnocení CC a měření

- Kategorie 1-3 dle stavu CC – počet řad CC
- Měření průměru COC před a po *in vitro* maturaci – určení míry expanze CC

Vizuální hodnocení oocytů

- Kategorie 1-3 dle homogennosti a odstínu ooplasmu
- Tvar oocytu, přítomnost PB

Imunofluorescence a barvení lipidů

Imunofluorescenční analýza: alfa-tubulin

- Fixace 4% PFA 50 min, RT
- Permeabilizace 0,5% Triton X-100 15min
- Primární protilátka myší anti-tubulin (T6793, Sigma) přes noc ve 4 °C
- Sekundární protilátka anti-myší Alexa Fluor 488 1 hod, RT, tma

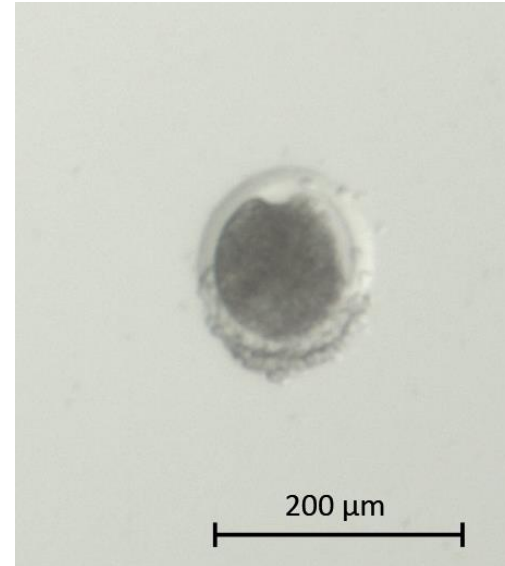
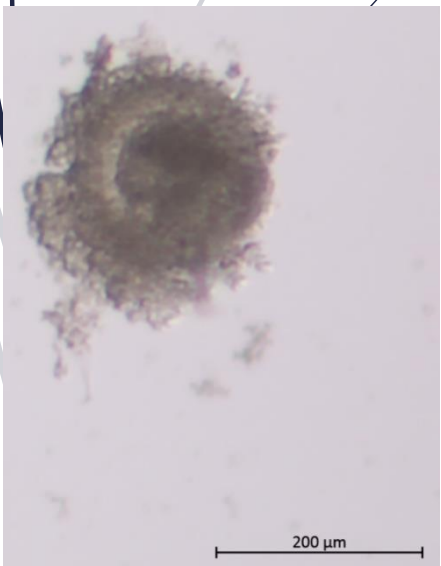
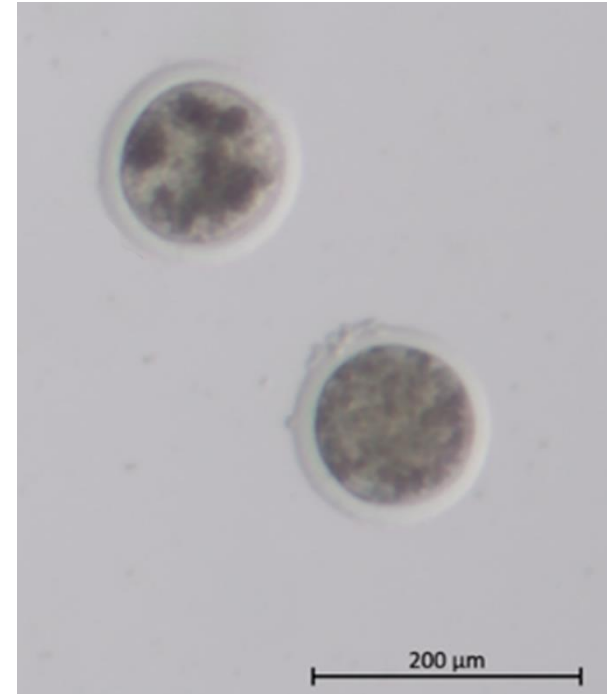
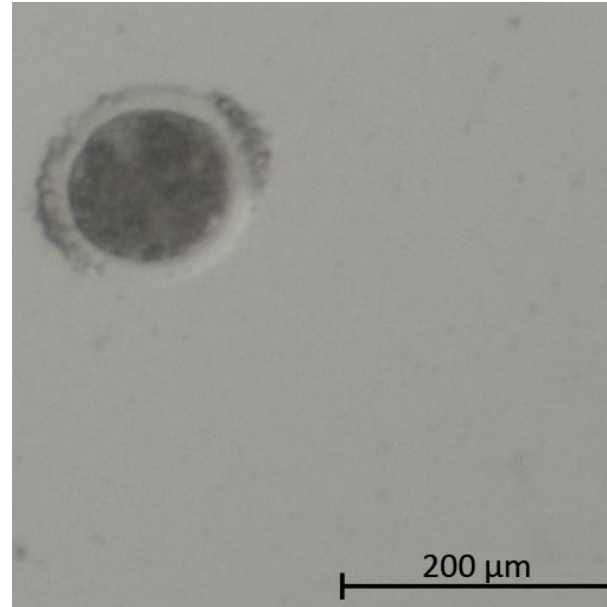
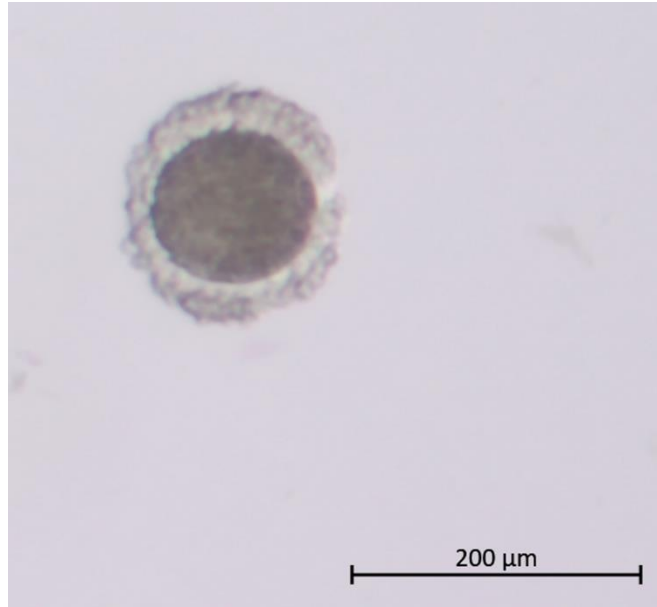
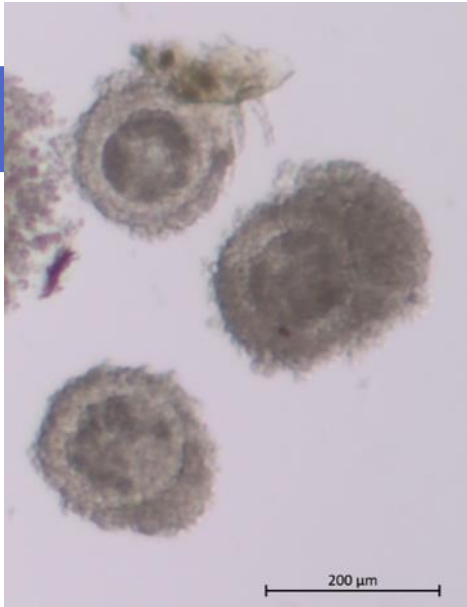
NileRed – sledování lipidů

- Inkubace v 10 µg/ml roztoku NileRed (Invitrogen) v 0,4% BSA/PBS 40 min, RT
- Montování na sklíčko VECTASHIELD HardSet Mounting Medium with DAPI → konfokální mikroskop Leica SP5

Sledování lipidových dropletů

- Měření intenzity signálu
- Velikost dropletů – rozdělení do 3 kategorií:
 - Malé, střední a velké
- Rozmístění dropletů v cytoplazmě
 - Homogenní x heterogenní (shluky)

Hodnocení morfologie kumulárních buněk



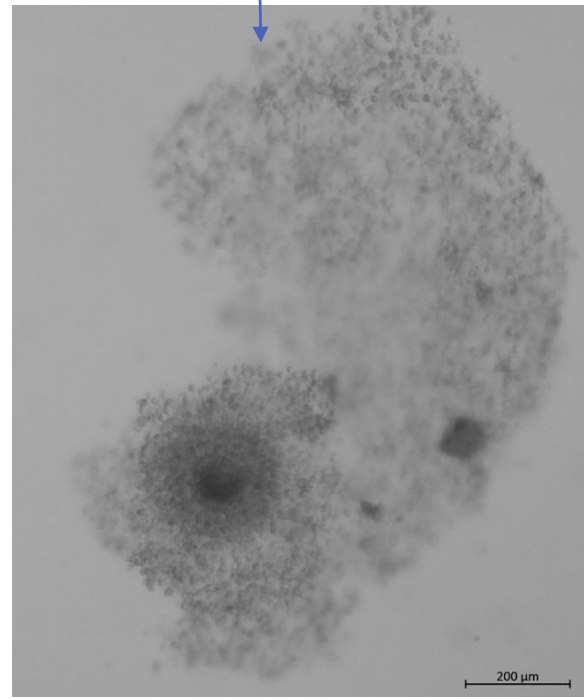
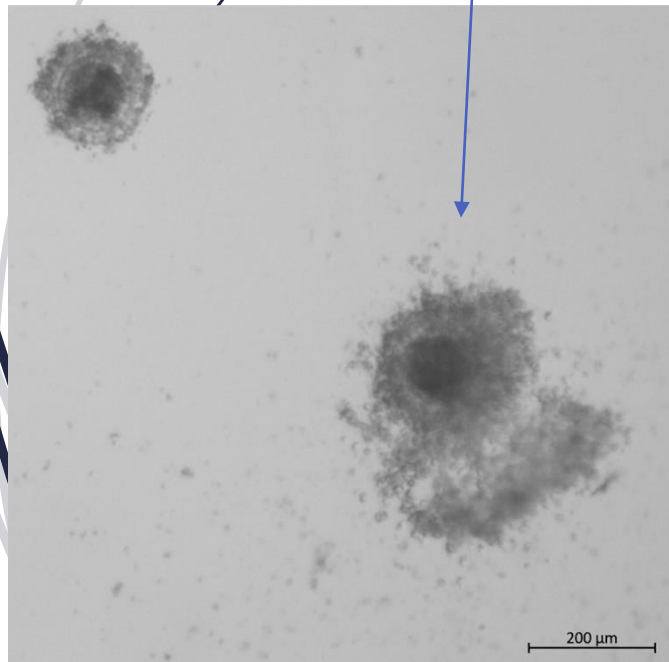
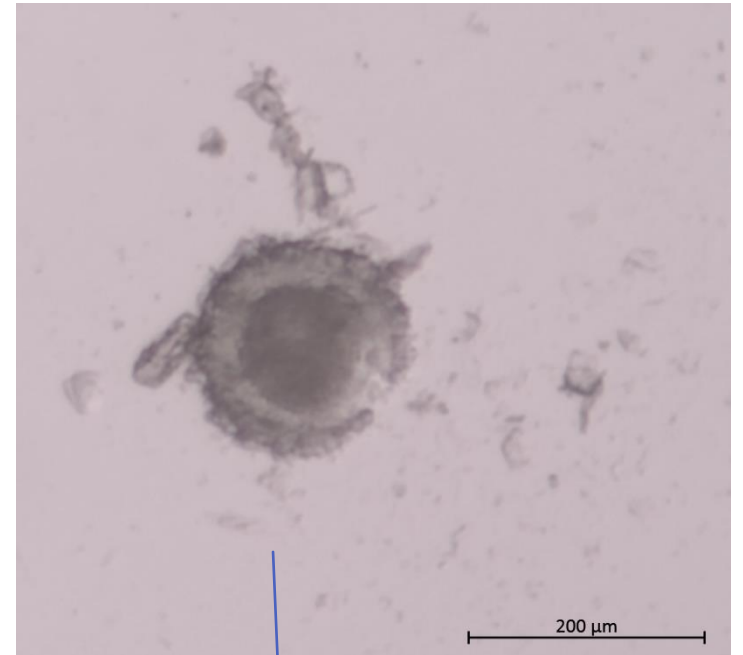
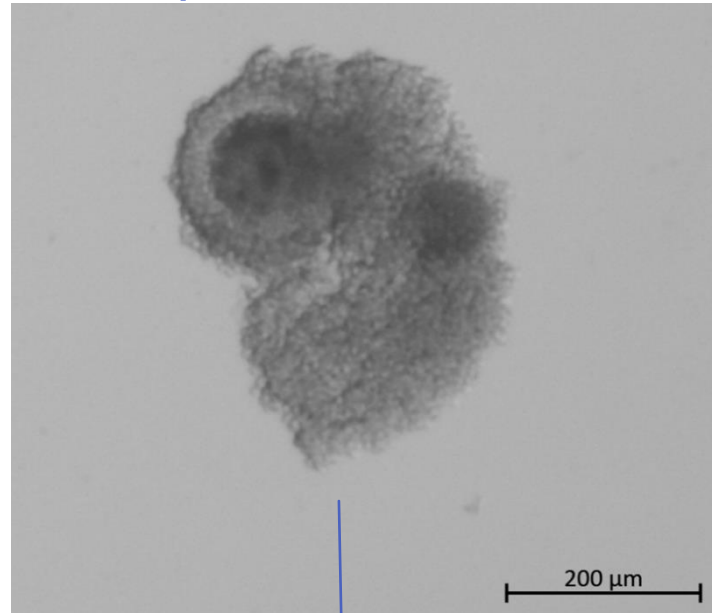
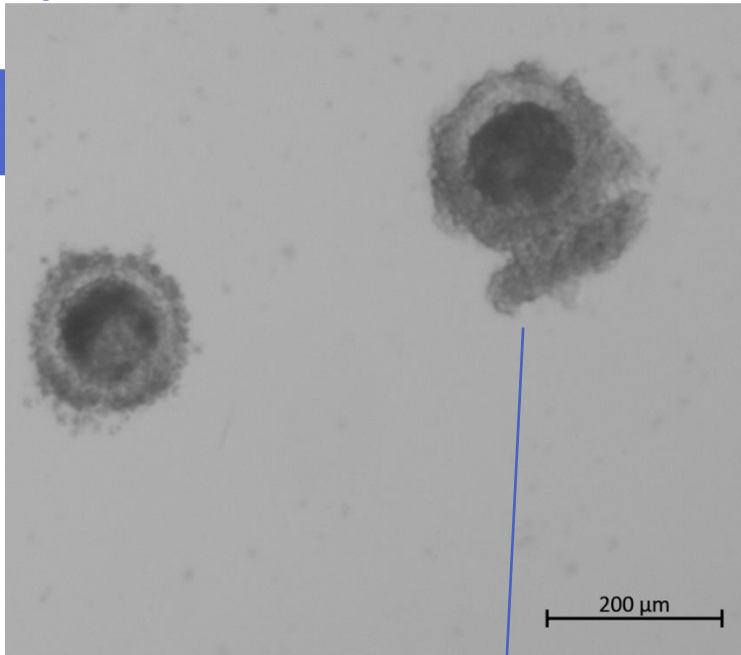
Kategorie 1
oocyt s několika řadami
kumulárních buněk

Kategorie 2
oocyt s 2 – 5 řadami
kumulárních buněk

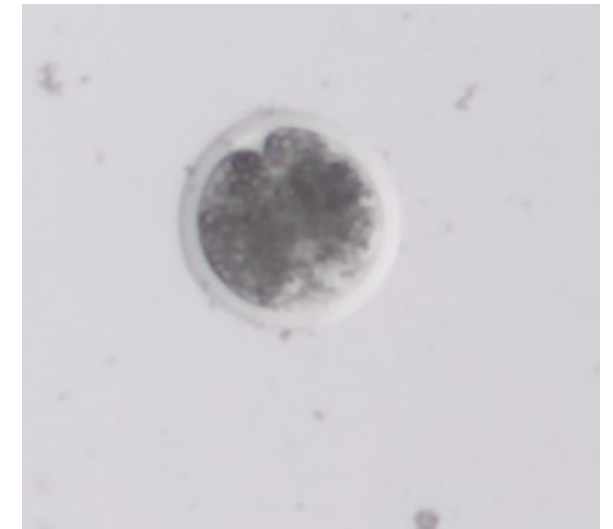
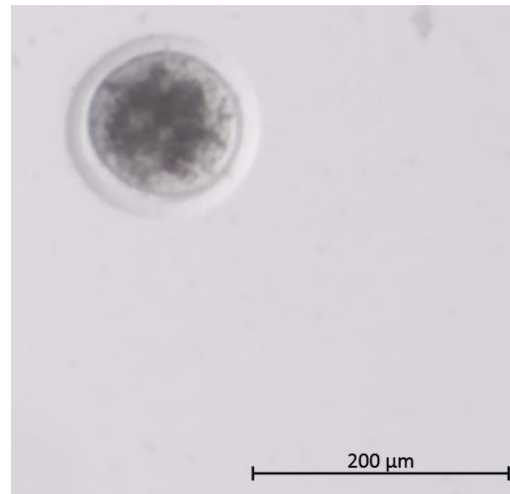
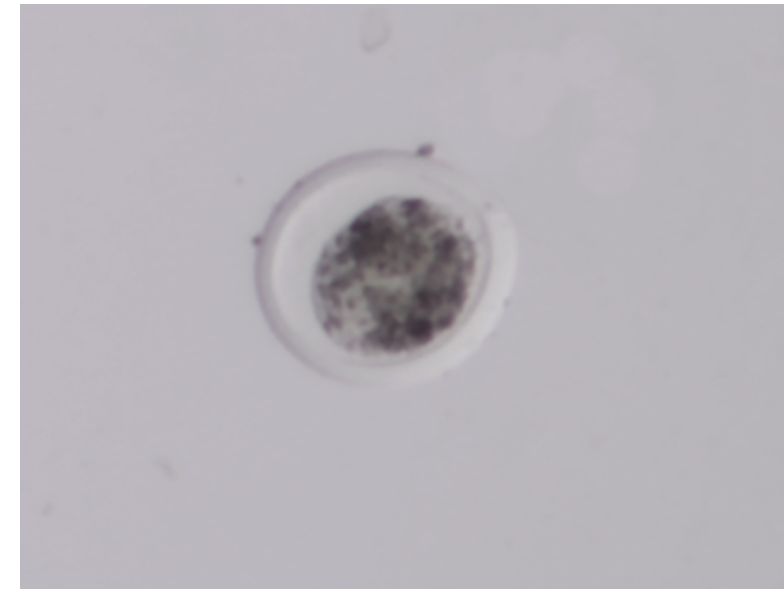
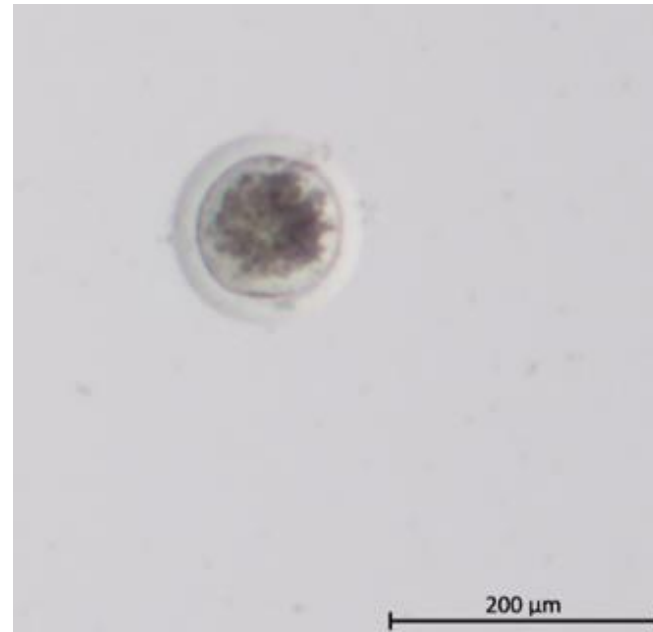
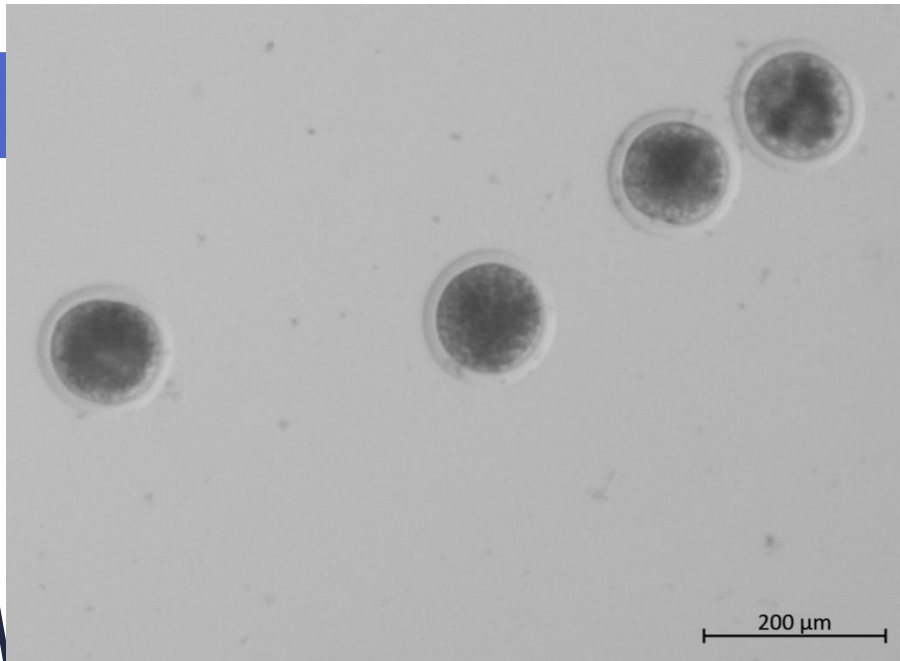
Kategorie 3
oocyt s jednou řadou CC
(i částečně obklopen)

**Oocyty bez kumulárních
buněk**

Expanze kumulárních buněk po 24h maturaci



Vizuální hodnocení morfologie oocytů

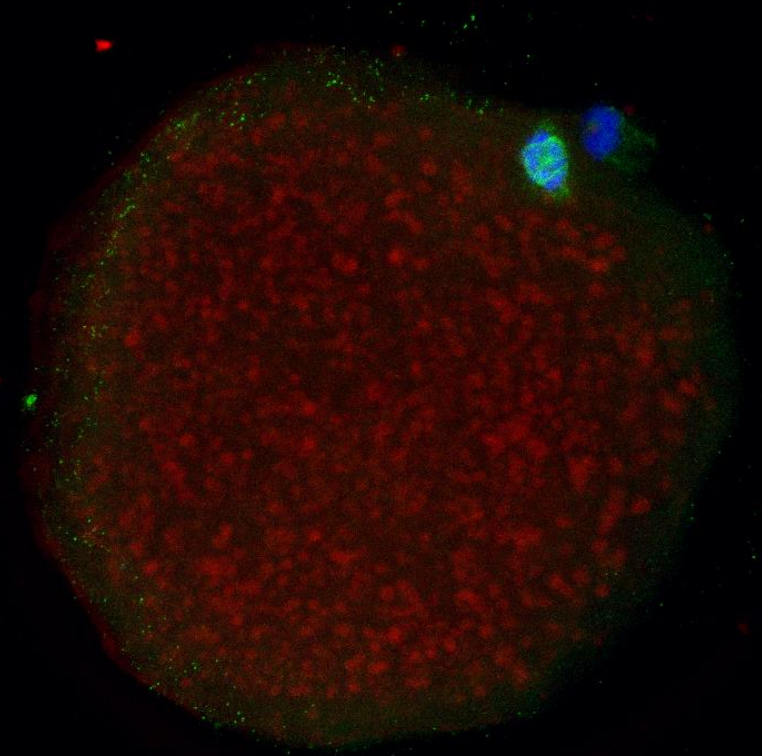
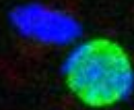


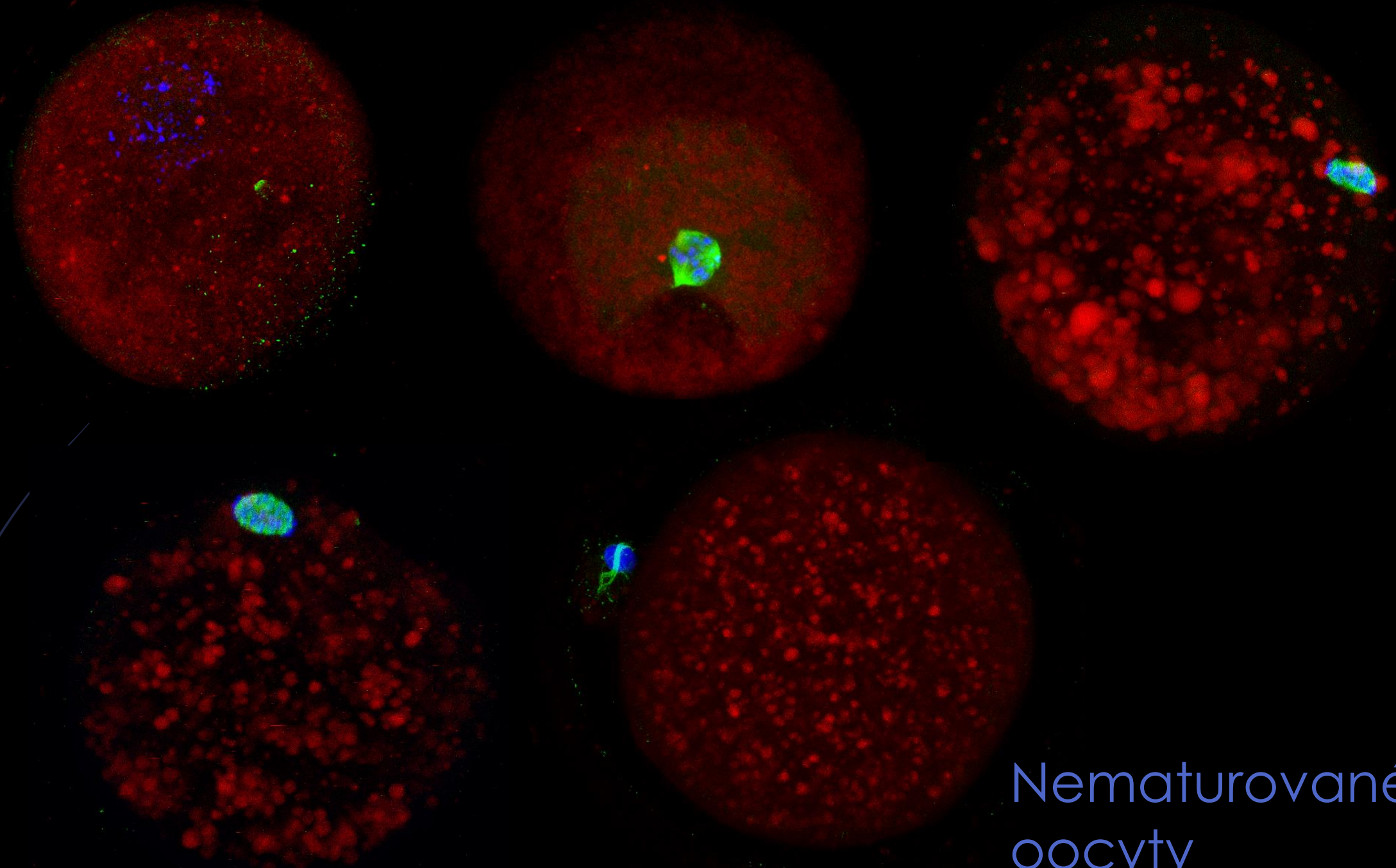
Kategorie 1
homogenní, případně
mírně granulované oocyty

Kategorie 2
granulované oocyty

Kategorie 3
granulované,
fragmentované

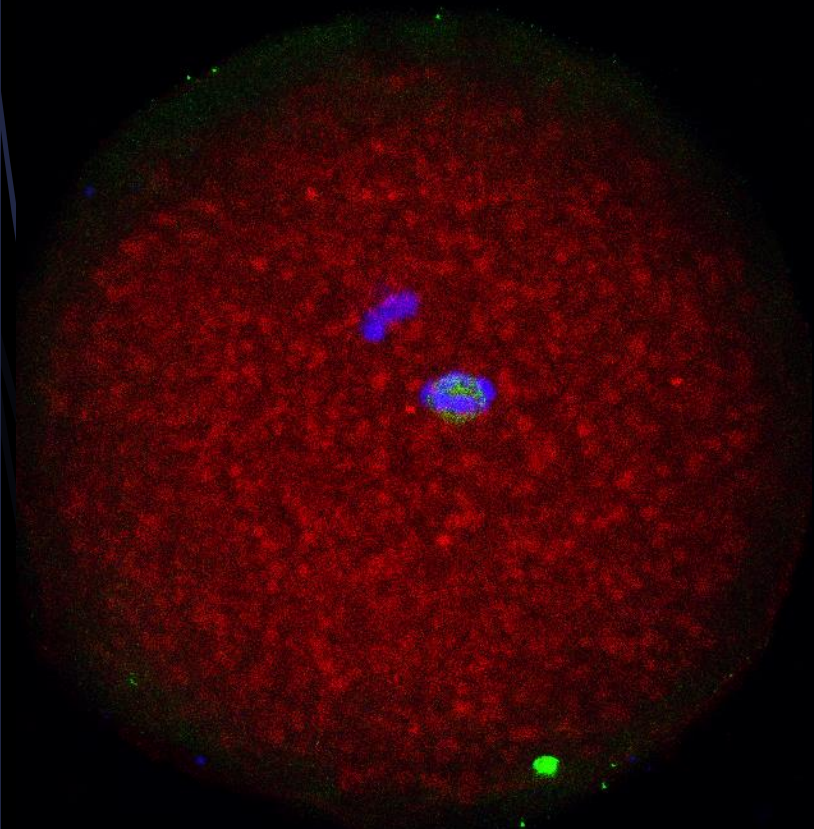
Maturované oocyty



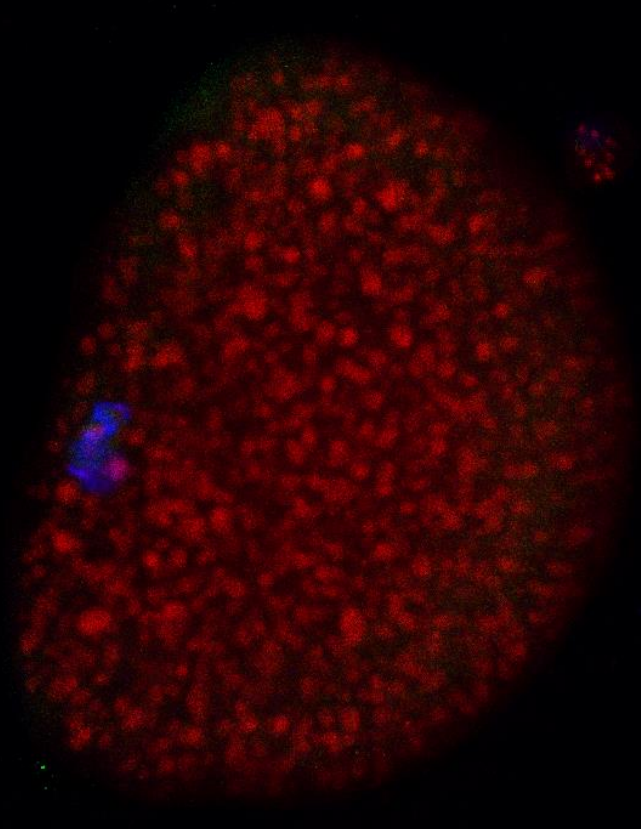


Nematurované
oocyty

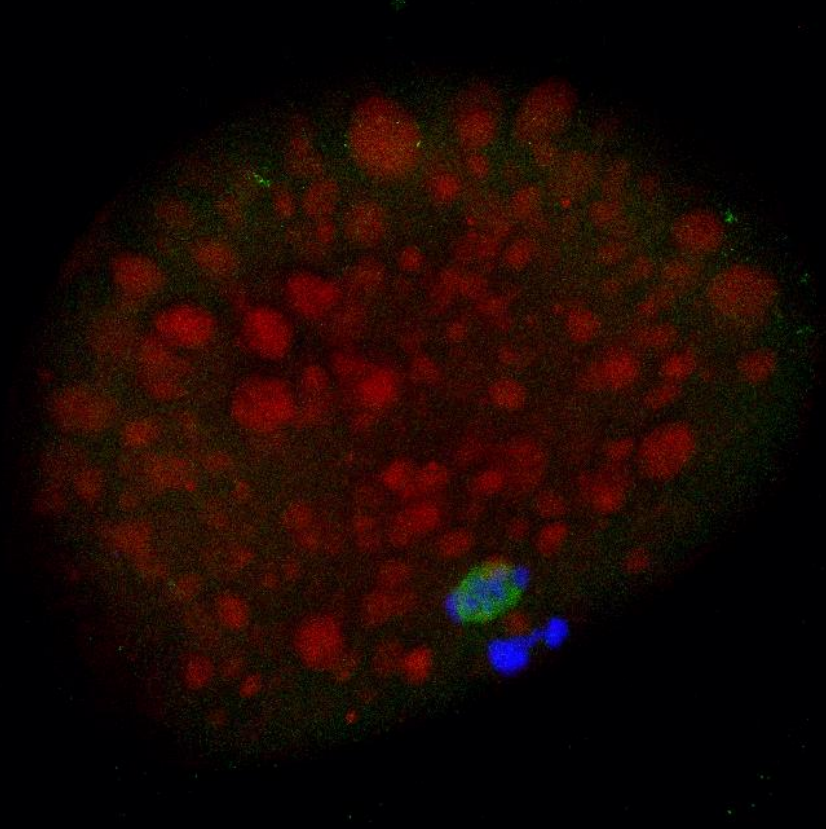
Morfologie lipidových dropletů



malé



střední

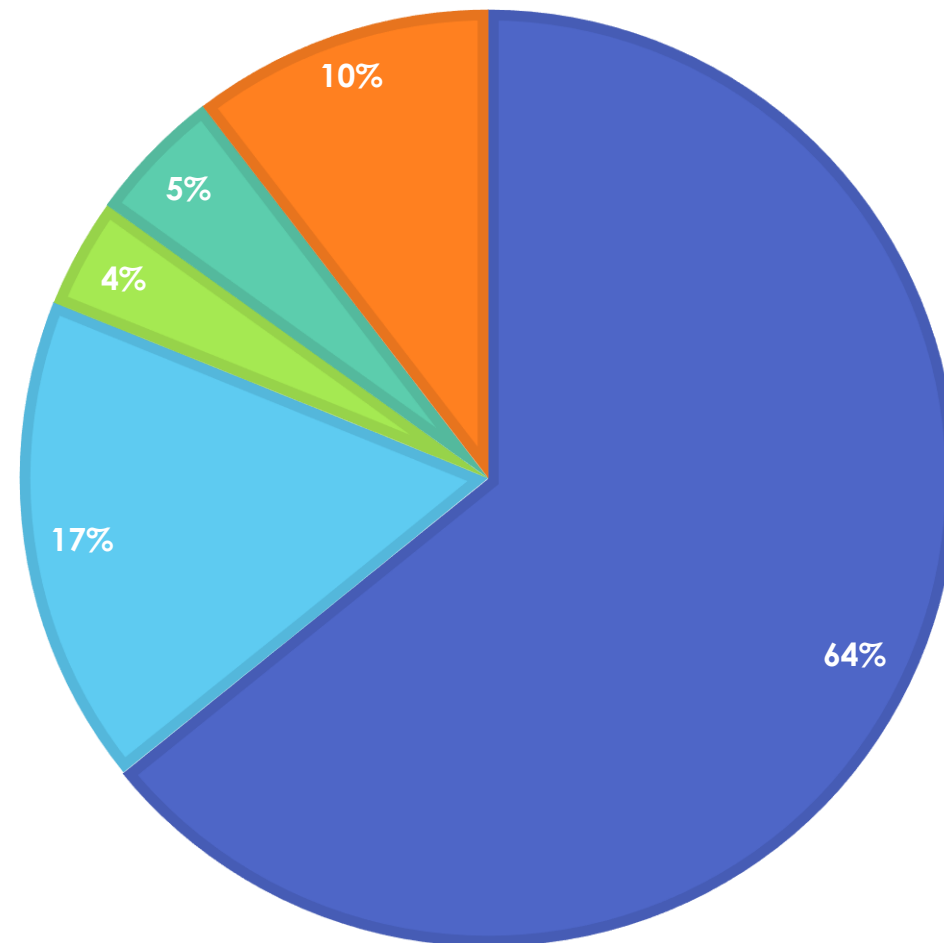


velké

Celkem bylo hodnoceno 106 oocytů
(v 8 samostatných experimentech)

MATURACE OOCYTŮ

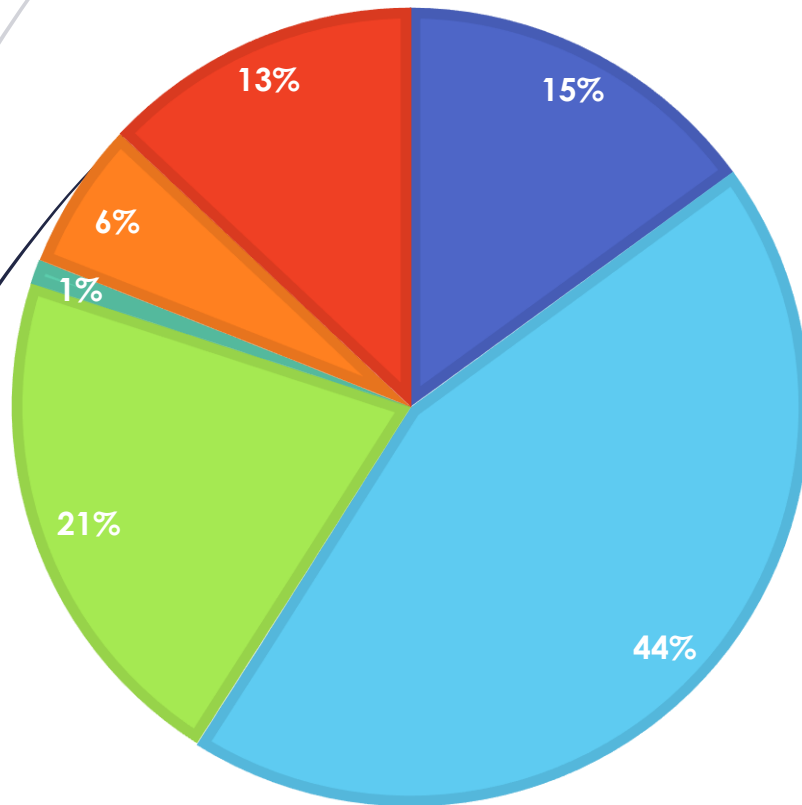
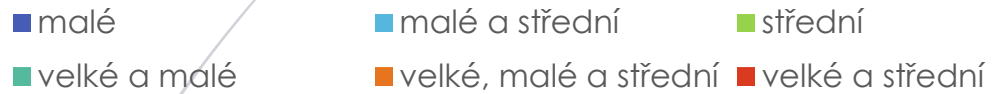
■ MII ■ MI ■ GVBD ■ GV ■ deg



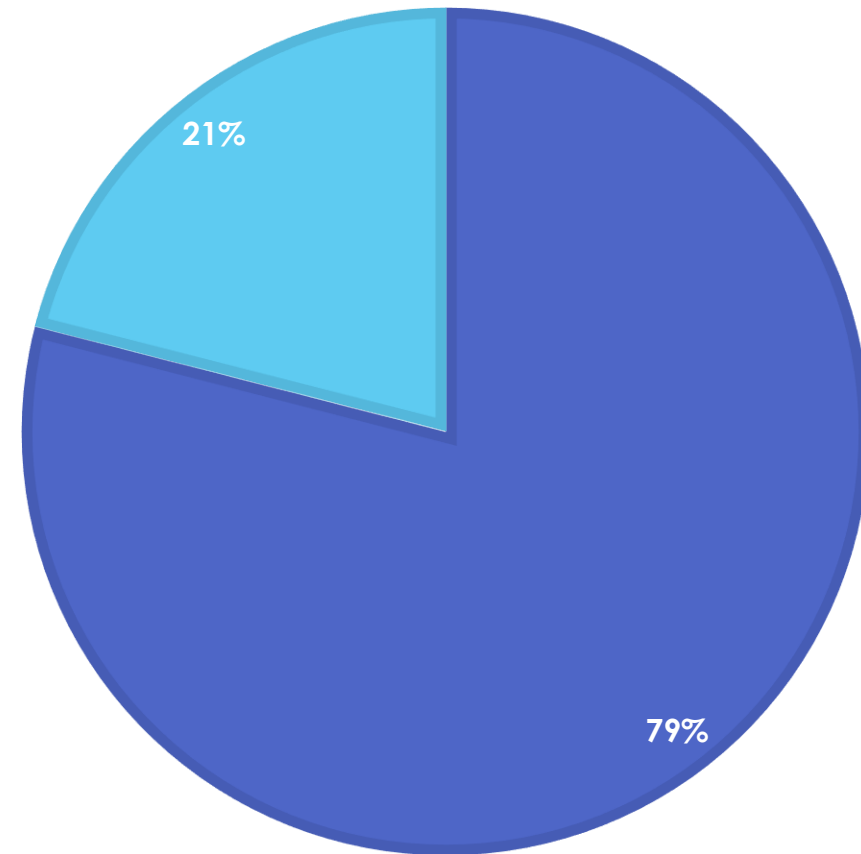
Lipidy

- Nejčastěji byla sledována kombinace malých a středních lipidů s homogenním rozložením v cytoplasmě

VELIKOST



DISTRIBUCE





Plány do budoucna

- ▶ Vyhodnocení dvou posledních pokusů (Exp9 a Exp10 z 10/2022) – celkem 92 oocytů
- ▶ Kompletace výsledků s parametry získanými z chovu (úspěšnost zabřeznutí, poměr T/P v mléce apod.) – statistická analýza
- ▶ *In vitro* oplození OPU oocytů – sledování dělivosti a úspěšnosti vývoje do stádia blastocysty (7 – 8 dní)

Děkuji za pozornost



Ústav živočišné fyziologie a genetiky AV ČR, v. v. i.

Laboratoř vývojové biologie

Rumburská 89

277 21 Liběchov



kinterova@iapg.cas.cz