



# Embriju iegūšana no govīm un laborijā, to transference

Ilga Šematoviča

Dr.med.vet., veterinārārste

LLU VMF Klīniskais institūts

Jelgava, 2021

# Dalība profesionālajās organizācijās:

- **IETS**

(eng. *International Embryo Technology Society*);



- **AETE**

(eng. *Association of Embryo Technology in Europe*);



- **ESDAR**

(eng. *European Society for Domestic Animal Reproduction*);



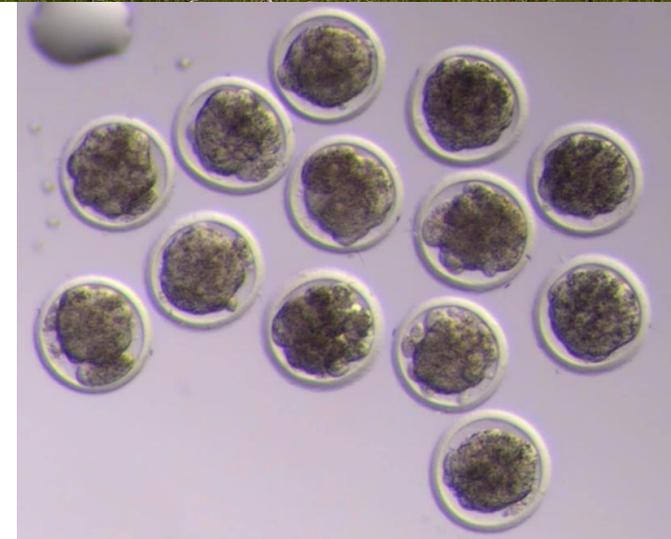
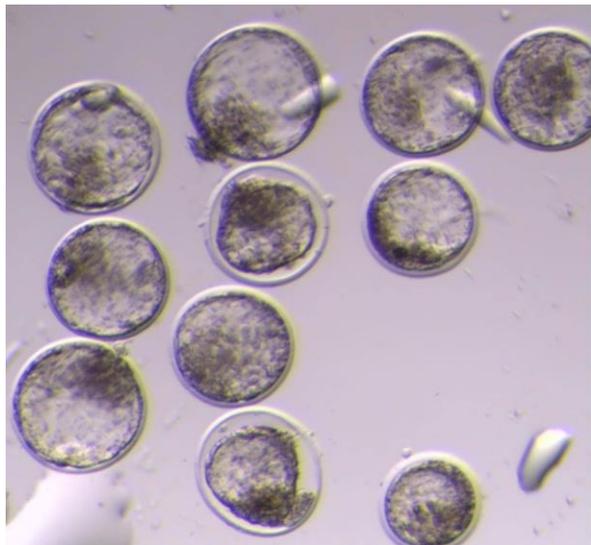
- **EAAP**

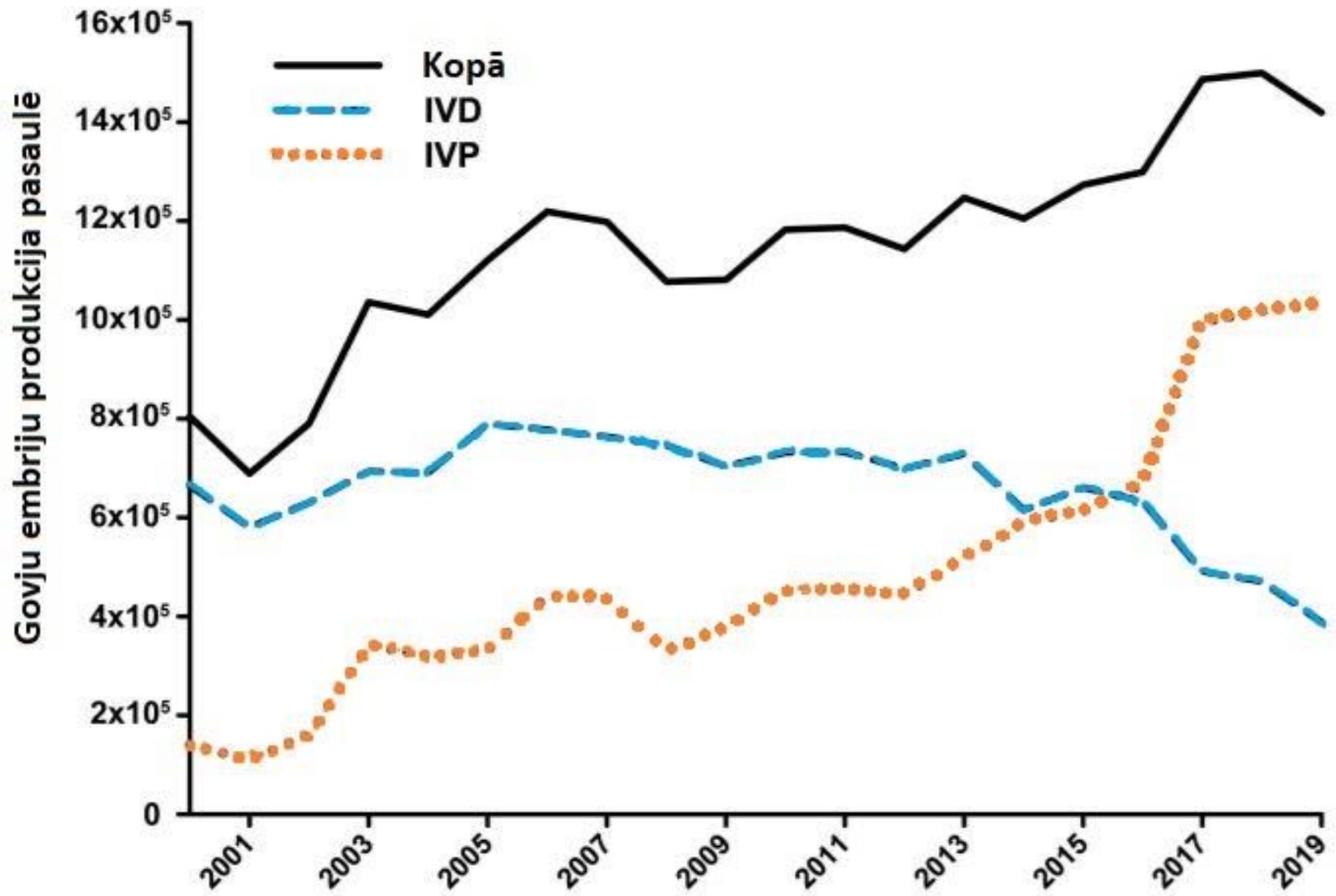
(eng. *The European Federation of Animal Science*);



- **LVB** (Latvijas Veterinārārstu biedrība)







*In vivo* iegūtie (IVD) un *in vitro* radītie (IVP) govju embriji 2000-2019

# ART govīm Latvijā

Saīsinājums	Metode
MA ( <i>eng.</i> AI)	mākslīgā apsēklošana
ET	embriju transference
MOET	multiplā ovulācija un embriju transference
OPU/IVF	oocītu aspirācija un in vitro fertilizācija

# Bez jau minētā - ART pasaulē:

- klonēšana,
- transģenēze,
- ksenotransplantācija,
- cilmes šūnu transplantācija,
- pirmsimplantācijas ģenētiskā diagnoze
- embriju dzimumšķirošana,
- spermas dzimumšķirošana,
- ICSI, u.c.

# ART vēsture pasaulē:

- 1890. gadā Valters Hīps (Walter Heape) veica 1. veiksmīgo ET trušiem;
- 1951. gadā pēc veiksmīgas ET piedzima pirmais teļš;
- 1960. gados - neķirurģiska EF, ET;
- arvien tiek uzlabotas hormonālās shēmas liellopiem;
- attīstās, tiek izkoptas iepriekš minētās ART

# ART vēsture Latvijā

- 1984 – k/za „Tērvete”, pr-tājs V.Gredzens kopā ar v.ā. L.Liepu un J.Pīlāpu veica pirmo ET govīm *in vivo* Baltijā, laikā no 1986-1990 tika iegūti 711 teļi;
- 1986-1990 līgumprojekts ar LR L/s ministriju „Govju ovocītu kultivēšana ar sekojošu to apaugļošanu *in vitro*, embriju kriokonservācijas un transplantācijas metožu izkopšana” (G.Preiberģs, I.Afanasjevs u.c.);
- pirms 20 gadiem „Vidzemes Veterinārā servisa” v.ā. E.Juitinovičs transferēja 10 iepirktus kriokonservētus embrijus. Vēlāk piedzima 2 bullīši.
- 2005. gadā v.ā. I.Zemnieks sadarbībā ar MA tehniķi I.Kansku veica transferenci z/s „Ogre”. Par projekta līdzekļiem bija iegādāti 24 kriokonservēti embriji. Piedzima 4 telītes un 4 bullīši. Visi 4 bulli nonāca CMAS īpašumā tālākai izaudzēšanai.

# Pamatojums ART attīstībai LV:

- Uz 2016 bija un joprojām ir aktuālas Ciltsdarba programmas:
  - LB šķirnes govju ģenētisko Resursu saglabāšanas programma no 2014.gada un turpmāk” (tagad 2019 un turpmāk; <https://www ldc.gov.lv/lv/media/93/download>);
  - LZ govju šķirnes saglabāšanas programma 2016-2026 (tagad 2019-2029; <https://www ldc.gov.lv/lv/nacionala>);
- bija spēkā MK noteikumi Nr.566 „Kārtība, kādā apmāca fiziskās personas, kas veic l/s vērtēšanu, pārraudzību, MA, **olšūnu** un embriju transplantāciju, un kārtība, kādā šīm personām izsniedz un anulē sertifikātus un apliecības” parāda, ka mūsu valstī netiek pilnvērtīgi izmantotas pasaulē pielietotās biotehnoloģijas šo mērķu īstenošanai (<http://likumi.lv/doc.php?id=233738>);
  - Tagad MK Nr.116 Prasības personām, kas nodarbojas ar lauksaimniecības dzīvnieku vērtēšanu, snieguma pārbaudi un pārraudzību, mākslīgo apsēklošanu, **olšūnu** un embriju transplantāciju (<https://www.vestnesis.lv/op/2019/52.13>);
- Pēc Eiropas Embriju Transferences asociācijas datiem uz 2017. gadu 20 ES valstīs, kā arī Krievijā un Kazahstānā realizē ET un saistītās ART. Bosnija Hercogovina, Horvātija, Grieķija, Turcija un **arī Latvija bija valstis, kurās šī nozare nebija attīstīta.**

# LLU realizētie Projekti ART jomā

Finansētājs	Nosaukums	Partneri
<p>ERAF 1.1.1.1. Praktiskas ievirzes pētījumi</p>  <p>IEGULDĪJUMS TAVĀ NĀKOTNĒ</p>	<p>“Govju ģenētisko resursu saglabāšana Latvijā pielietojot embriju transferenci un ar to saistītās biotehnoloģijas” (BioReproLV), 1.1.1.1/16/A/025, 01.04.2017 - 31.03.2020.</p>	<p>LŠDZAS</p> 
<p>LAD, ELFLA, „Sadarbība” 16.2.apakšpasākums</p>  <p>Atbalsta Zemkopības ministrija un Lauku atbalsta dienests</p>	<p>“Latvijas vietējo govju ģenētiskā fonda saglabāšana un lokālajiem apstākļiem piemērotu citu šķirņu indivīdu pavairošana izmantojot oocītu aspirāciju”. Nr.19-00-A01620-000094, 04.01.2020 - pašlaik</p>	<p>AF Tērvete</p> 
<p>LLU pētniecības programmas īstenošana</p>  <p>Latvijas Lauksaimniecības universitāte</p>	<p>Endometrija pārmaiņas govīm saistībā ar FSH vai PMSG saturošu medikamentu pielietošanu multiplās ovulācijas inducēšanai.</p>	

# MOET un OPU/IVF mērķis:

Straujš ģenētiskais progress:

- šķirnes ietvaros (saglabājamās šķirnes);
- ganāmpulka ietvaros.

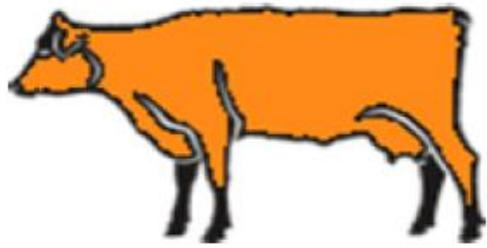
Ģenētiski augstvērtīgi pēcnācēji lielākā skaitā, nekā ir iespējams iegūt no govs fizioloģiski.



15 teļi, kas iegūti no vienas donorgovs Dānijā (Noakes et al., 2019)



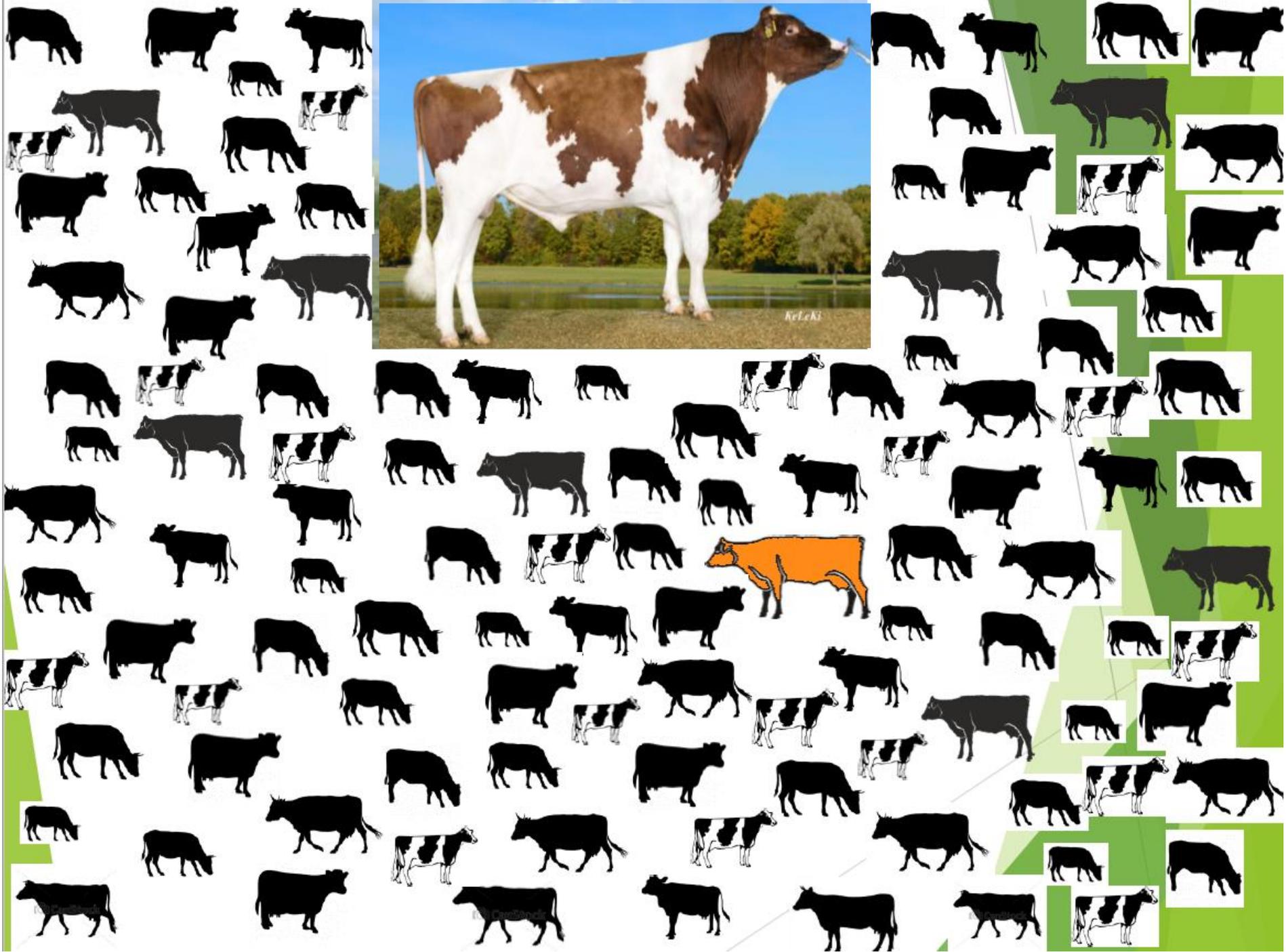
+

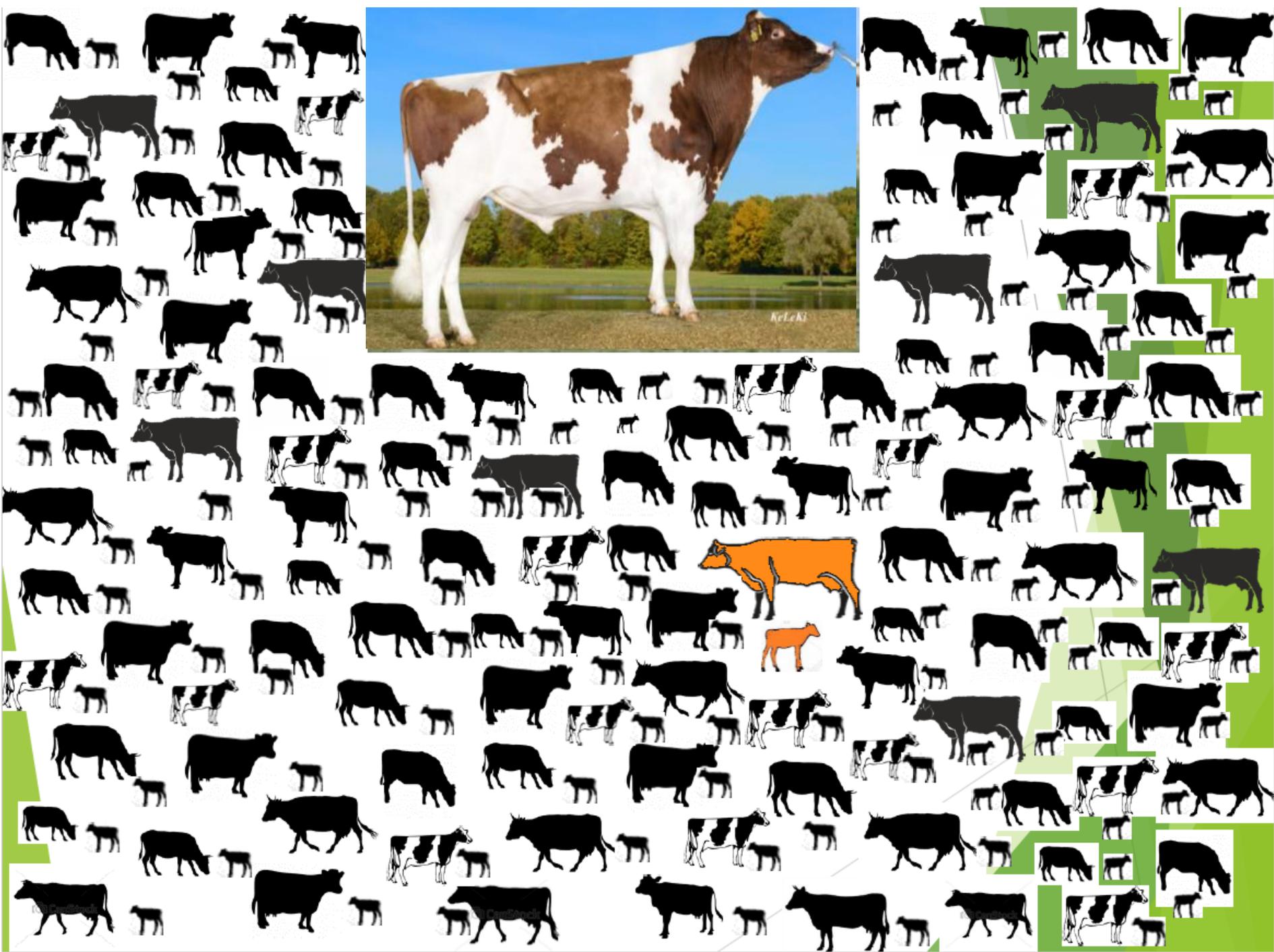


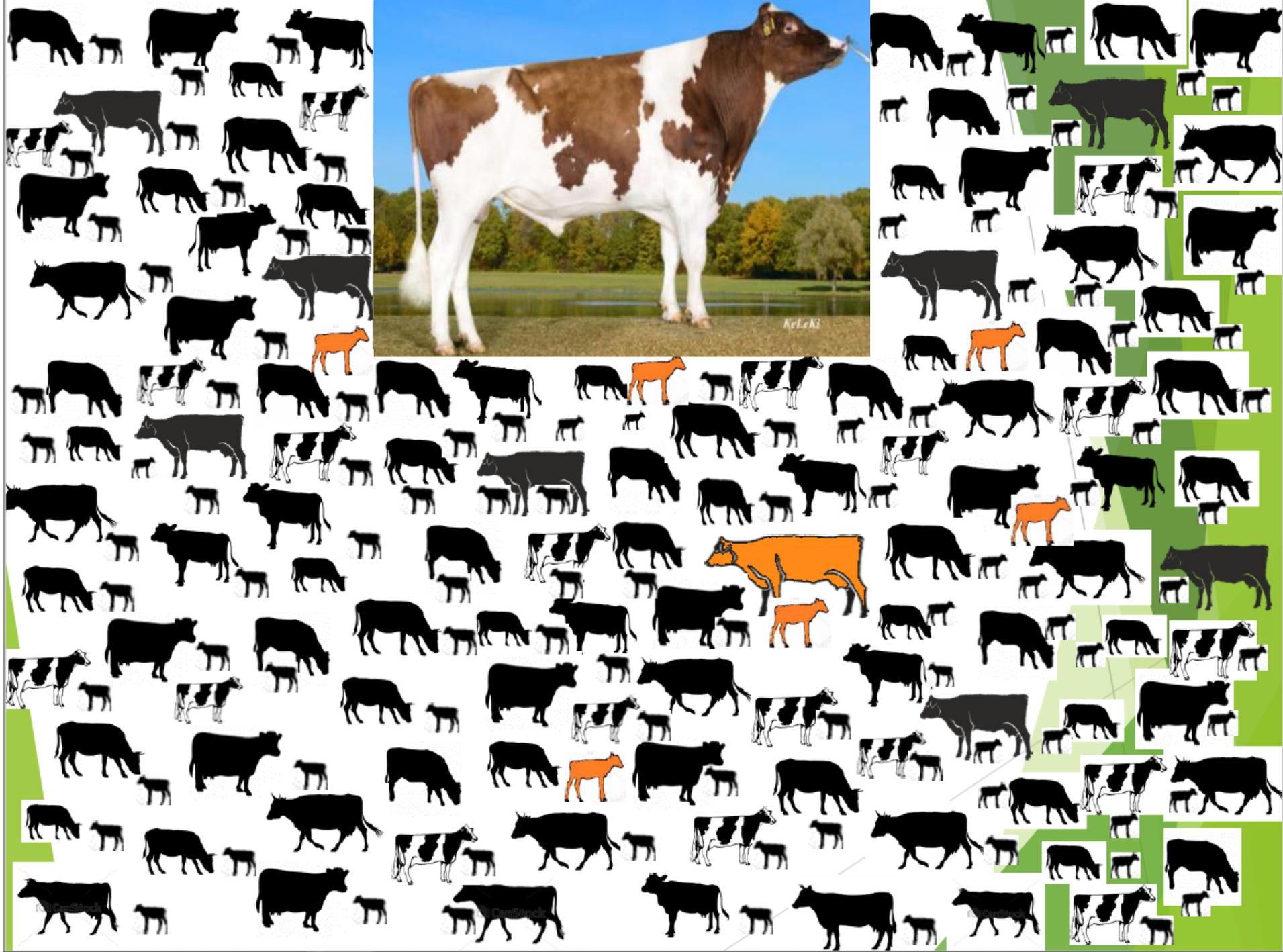


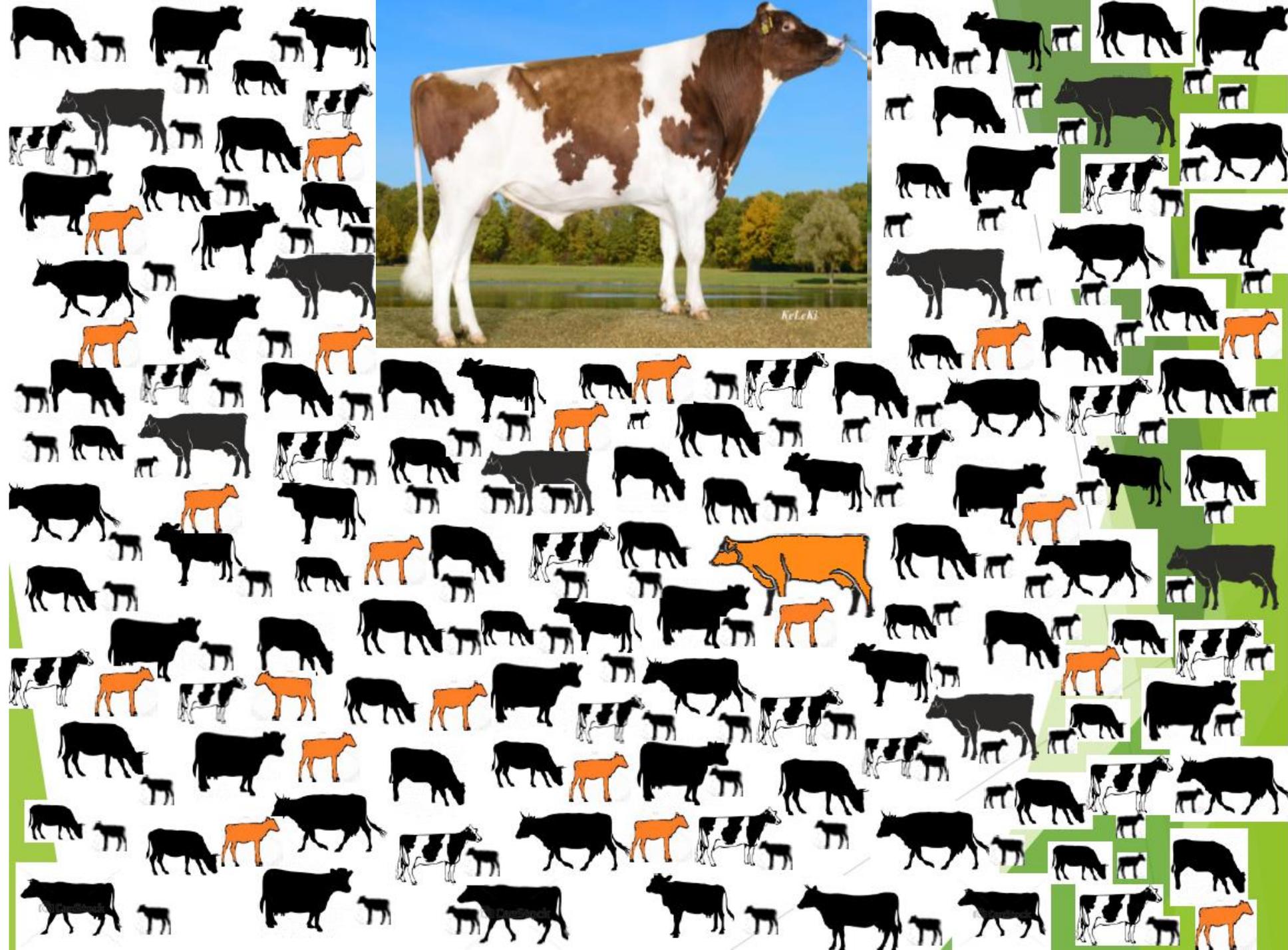
+











# Priekšnosacījumi, lai izvēlētos MOET, OPU/IVF, vai ET embriju iepērkot

- ETK, VM
- Veselība – infekcijas slimības, vides infekcijas, metrīti, mastīti SŠS, u.tml.
- MA vai lecināšanas rezultāti ganāmpulkā un konkrētajam dzīvniekam
- Informācija no pārraudzības datiem
- Informācija no ganāmpulka veselības vizītēm (ja tādas notiek)
- Informācija no ēdināšanas speciālista (barības deva, sastāvs, kvalitāte)
- Donorgovs kvalitātes un īpatnības, laktācijas fāze
- Atbilstošu recipientu pieejamība, to VM, veselības statuss, sinhronums ar donorgovi, atbilstība embrija vecumam, CL kvalitāte, individuālās īpatnības

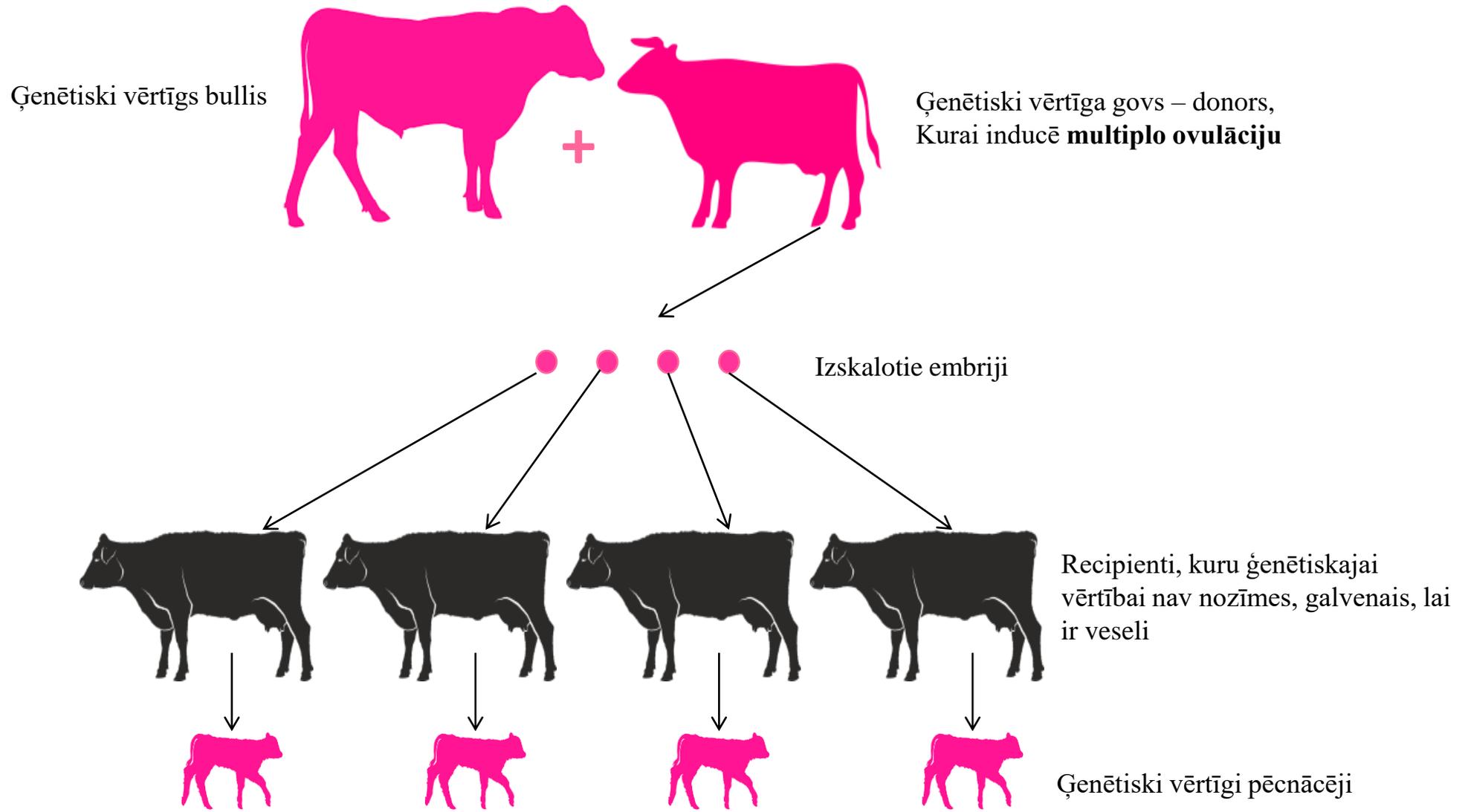
# MOET

Multiplā ovulācija jeb superovulācija un embriju transference  
(transplantācija?)

# Process ietver:

- Donor govs un buļļa izvēle – ciltsdarbs, ģenētiskā vērtība
- Multiplās ovulācijas indukcija
- Mākslīgā apsēklošana
- Embriju izskalošana
- Embriju atrašana, novērtēšana, iepildīšana pajetēs
- Svaigu embriju transference
- Kriokonservācija
- Atkausētu embriju transference

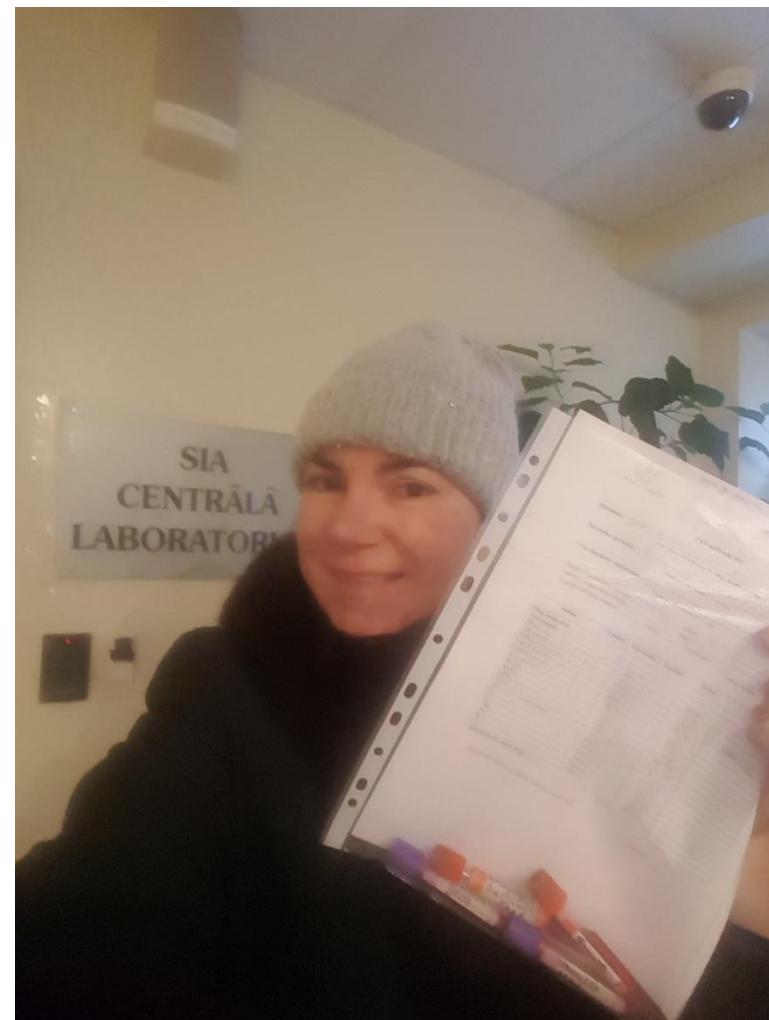
# MOET princips:



# Donorgovs izvēle - veselība

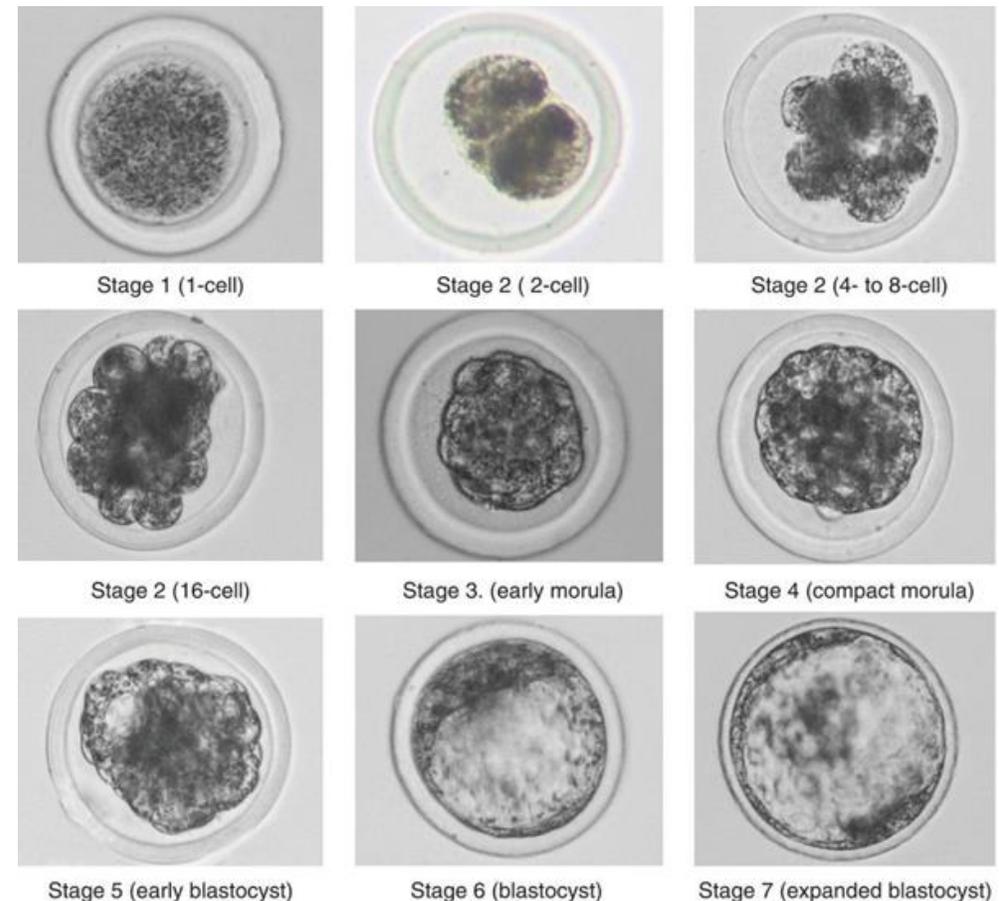
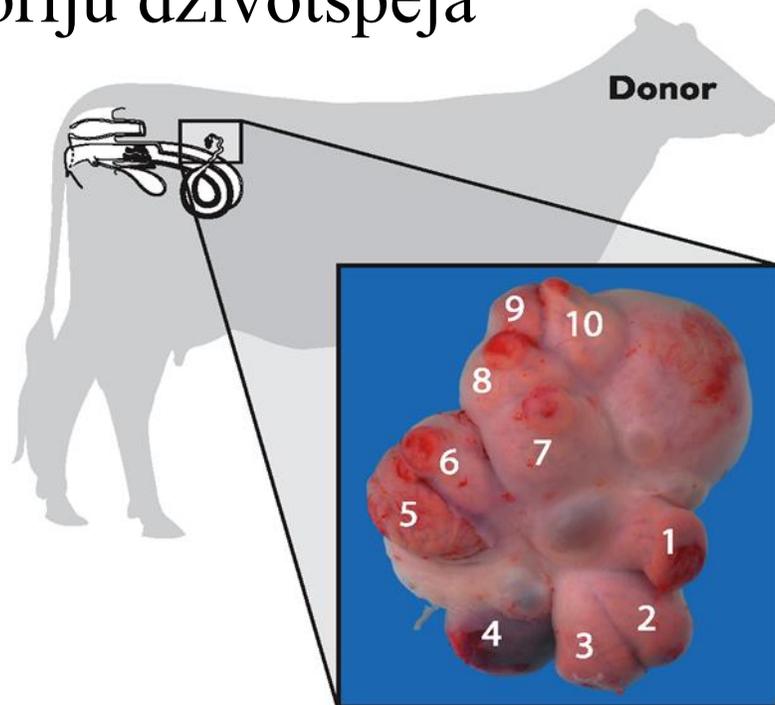


- Anamnēze
- Vispārējā izmeklēšana
- Eksprestesti
- Ultrasonogrāfija
- Laboratoriskie izmeklējumi



# Veselības stāvokļa un vielmaiņas nozīme

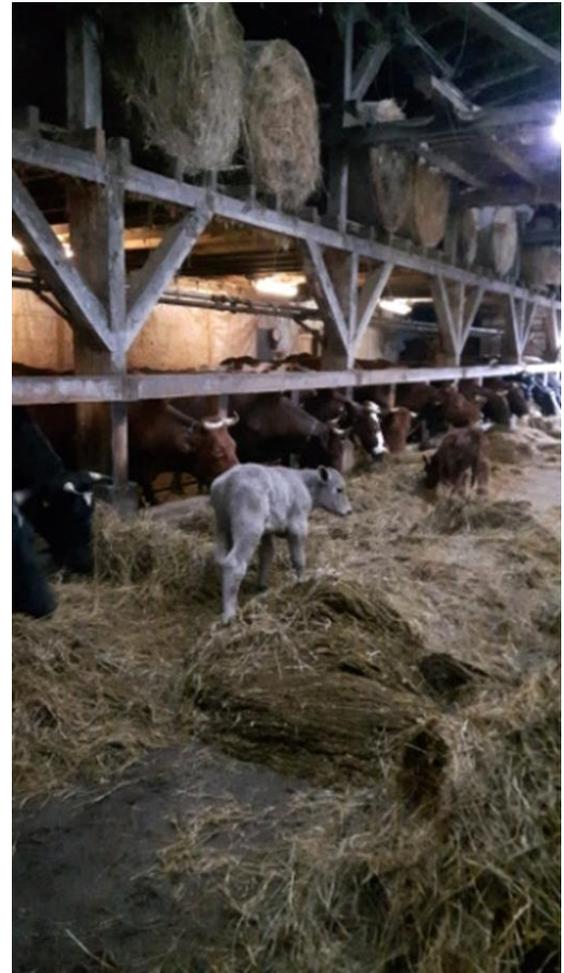
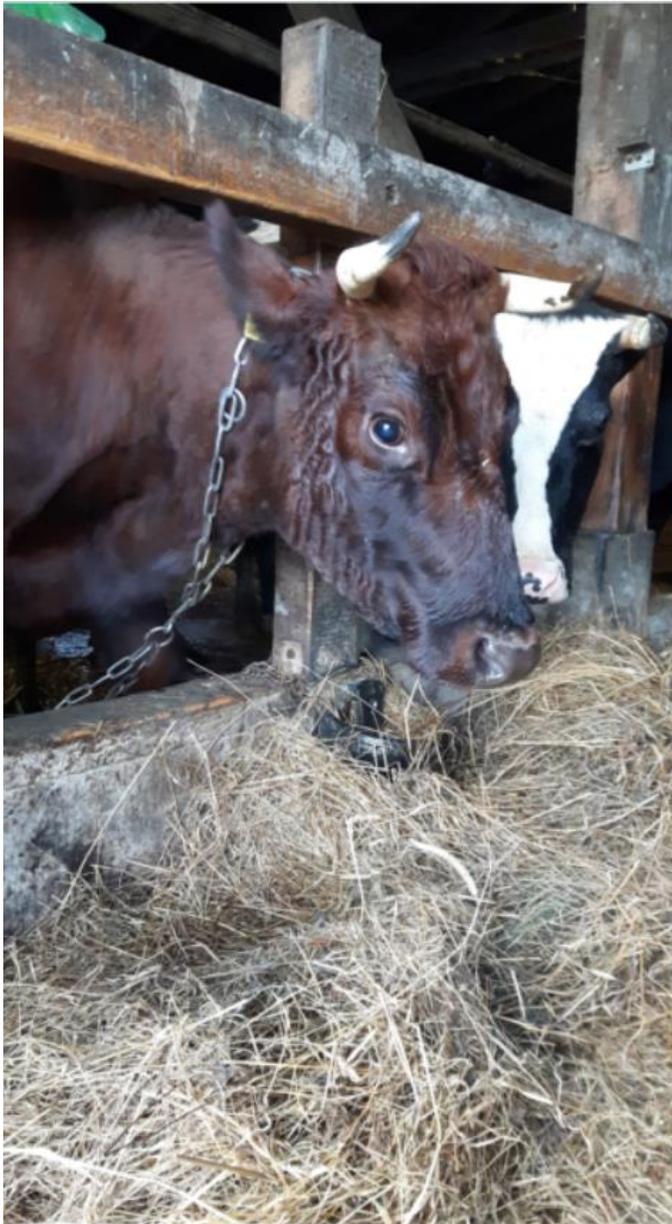
- Organisma reakcija uz medikamentiem
- Embriju skaits
- Embriju kvalitāte
- Embriju dzīvotspēja





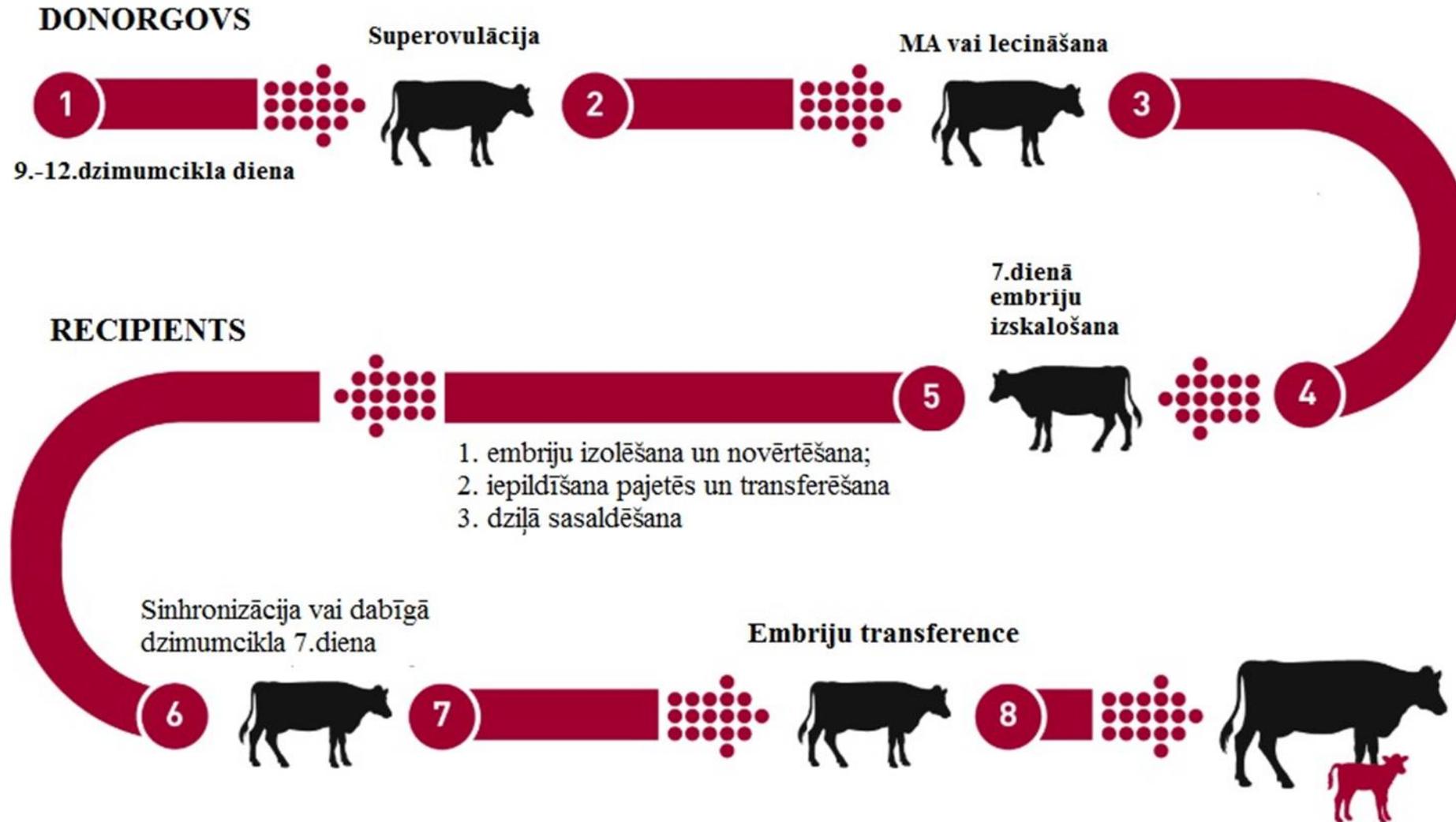








# MOET procesa etapi:



# Multiplā ovulācija



# MO inducēšanai pielietotie hormoni

- PMSG - stimulē gan folikulstimulējošo hormonu (FSH), gan luteinizētājhormonu (LH), pusizdalīšanās periods līdz 5 dienas.
- FSH - pusizdalīšanās periods ir aptuveni 6 stundas, līdz ar to ir jāveic daudzas injekcijas, lai ierosinātu superovulāciju.

# Multiplās ovulācijas inducēšana govīm

- FSH – Folltropin-V (Vetoquinol), Pluset (Biogénesis Bagó), Stimufol (Reprobiol), Ovagen (ICPbio Ltd)

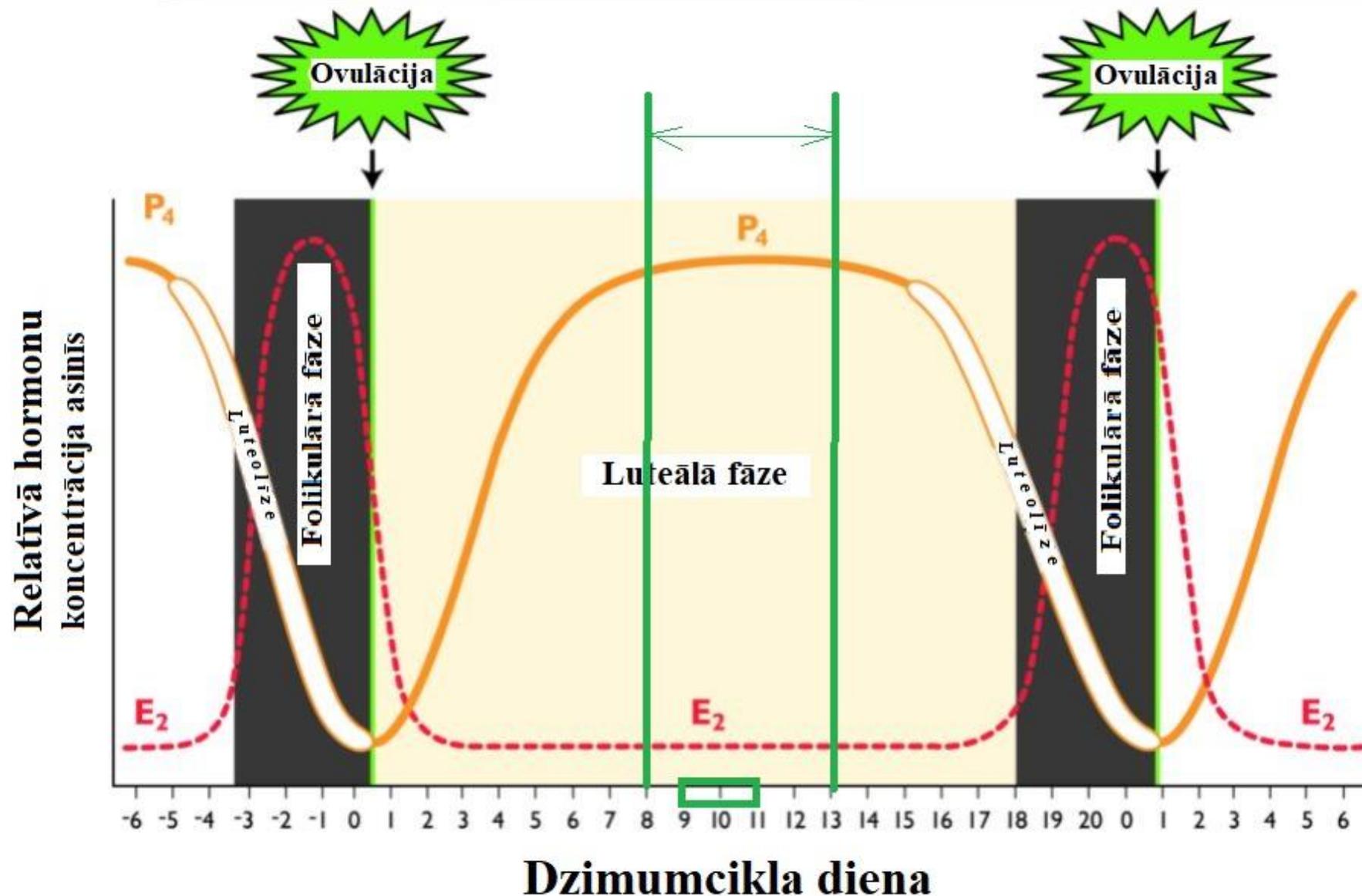


- PMSG – Folligon (Intervet), Sergon (Bioveta)



# Dažādi protokoli – šķirne, dzīvsvars, vecums

- Superstimulācijas diena
- **Jāzin dzimumcikla diena!**
- Var izmantot:
  - dabīgo dzimumciklu;
  - veikt sinhronizāciju.



# Protokoli - FSH

10	Donor	1:5	10	Reģistrācija
11	1g PGF <sub>2α</sub> (01)		11	
12	14g PGF <sub>2α</sub> (01)		12	
13	17g Oksita (0)		13	14g PGF <sub>2α</sub> (0) Estradiol divpakārti
14	27g FSH 2x 124 unreg. 800 20.00		14	
15	28g FSH 2x (FOLLTROPIN-V) 2,5ml (50mg)		15	2x PGF <sub>2α</sub> (0)
16	29g FSH 2x + PGF <sub>2α</sub> 800 - 20.00 2x		16	
17	30g FSH 2x		17	
18	31g Osmetmetus (0)		18	*Oksita (0) Pēcseagka
19	32g Barmātsaules zārnaiņi		19	
20			20	Metrephiam

		Donorgovs		Recipientgovis 5
Svētdiena	1.05. / 19.06. 31.07	dzemdes ārstēšana ar Metricure		
Otrdiena	03.05. / 21.06. 02.08.	8:00	Oestroph.	
Otrdiena	17.05. / 5.07. 16.08.	8:00	Oestroph.	Oestroph.
Piektdiena	20.05. / 8.07. 19.08.	meklēšanās		
Pirmdiena	30.05. / 18.07. 29.08.	8:00	FSH(2,5ml)	
		20:00	FSH(2,5ml)	
Otrdiena	31.05. / 19.07. 30.08.	8:00	FSH(2,5ml)	Oestroph.
		20:00	FSH(2,5ml)	
Trešdiena	1.06. / 20.07. 31.08.	8:00	FSH(2,5ml)	
			Oestroph.	
		20:00	FSH(2,5ml)	
			Oestroph.	
Ceturtdiena	2.06. / 21.07. 01.09.	8:00	FSH(2,5ml)	
		20:00	FSH(2,5ml)	
Piektdiena	3.06. / 22.07. 02.09.	8:00	1.sēklošana	meklēšanās
		20:00	2.sēklošana	
Sestdiena	04.06. / 23.07. 03.09.	ja nepieciešams, tad 3.sēklošana, bet bez saldēšanas nav jēgas		
Piektdiena	10.06. / 29.07. 09.09.	embriju skalošana		embriju pārstādīšana
Svētdiena- Pirmdiena	12.-13.06 / 31.07.- 01.08.	Oestroph.-2 devas		

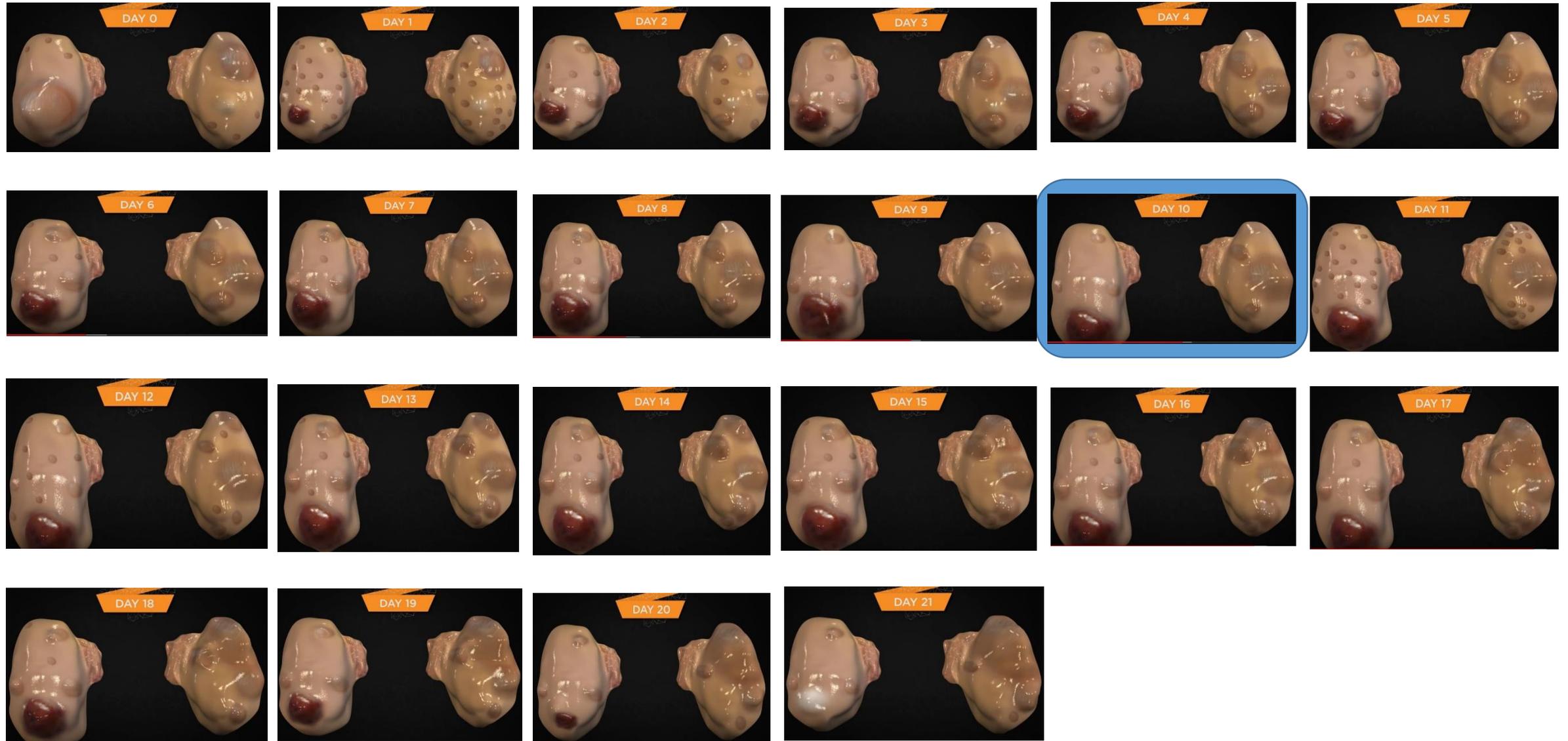
Oestrophan	14 devas	
FSH	20ml	
Sēklošana	2 x	

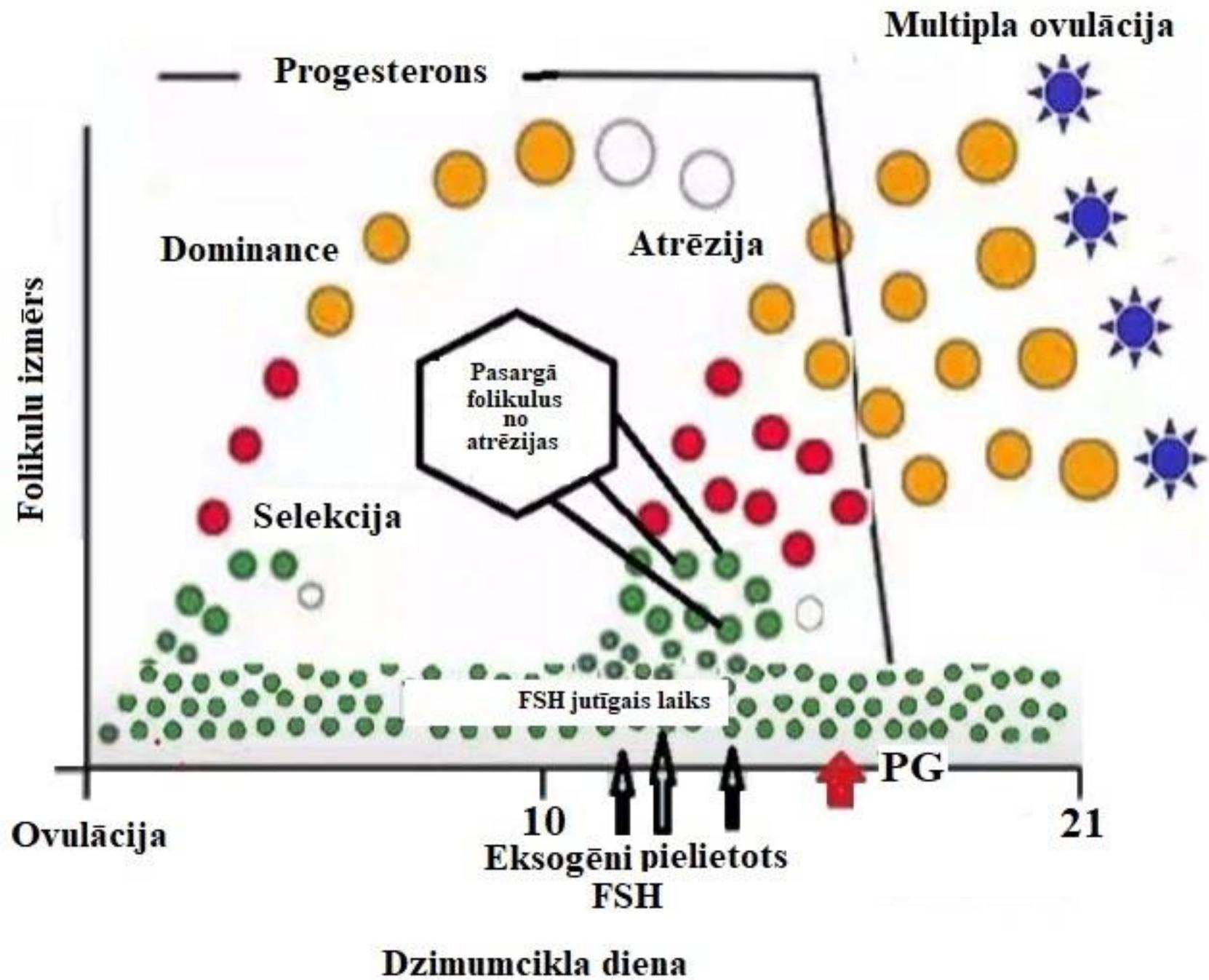
# Protokoli - PMSG

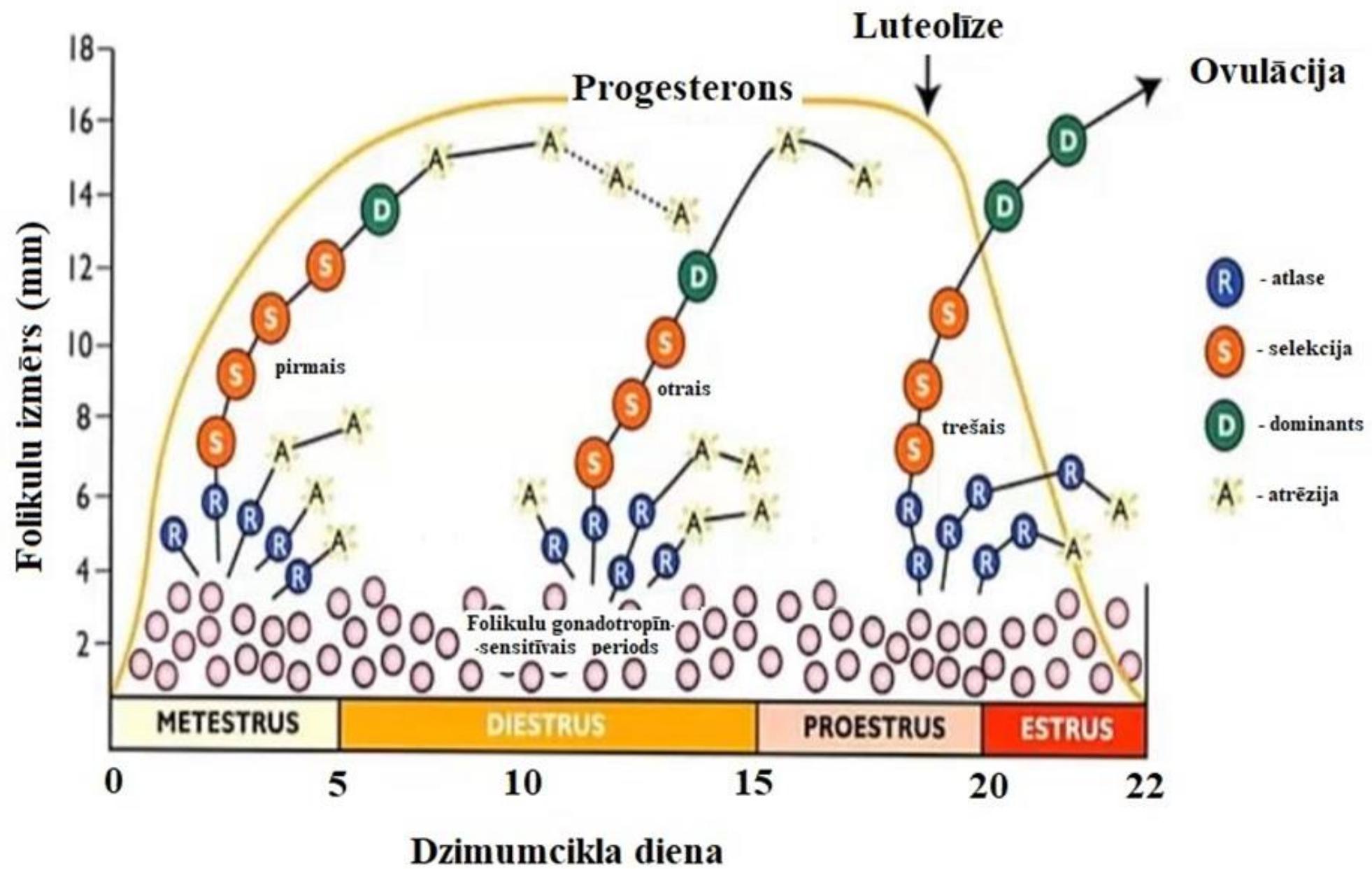
Superovulation treatment of donors by PMSG (Folligon) and synchronization of estrus in donors and recipients.

Days Māksl. cikls	Days Dabīgs cikls	Data	Donors	Recipients
1			PGF <sub>2</sub> α (Day 0)	
15			PGF <sub>2</sub> α	PGF <sub>2</sub> α
18			Estrus (Day 0)	
28	10-12	9.09.	Folligon (3000 IU per doonor)	
29	11.	10.09.	-	PGF <sub>2</sub> α
30	12.	11.09.	08.00 PGF <sub>2</sub> α + 20.00 PGF <sub>2</sub> α	
32	14.	13.09.	Estrus, 08.00 – 1st AI + 20.00 – 2nd AI	Estrus
33	15.		8.00 - 3d insemination if doonor in estrus	
39	21.	20.09.	Flashing of embryos	ET
	24.	23.09.	PGF <sub>2</sub> α	Dzīvo laimīgi

# Kas notiek olnīcās katrā dzimumcikla dienā?

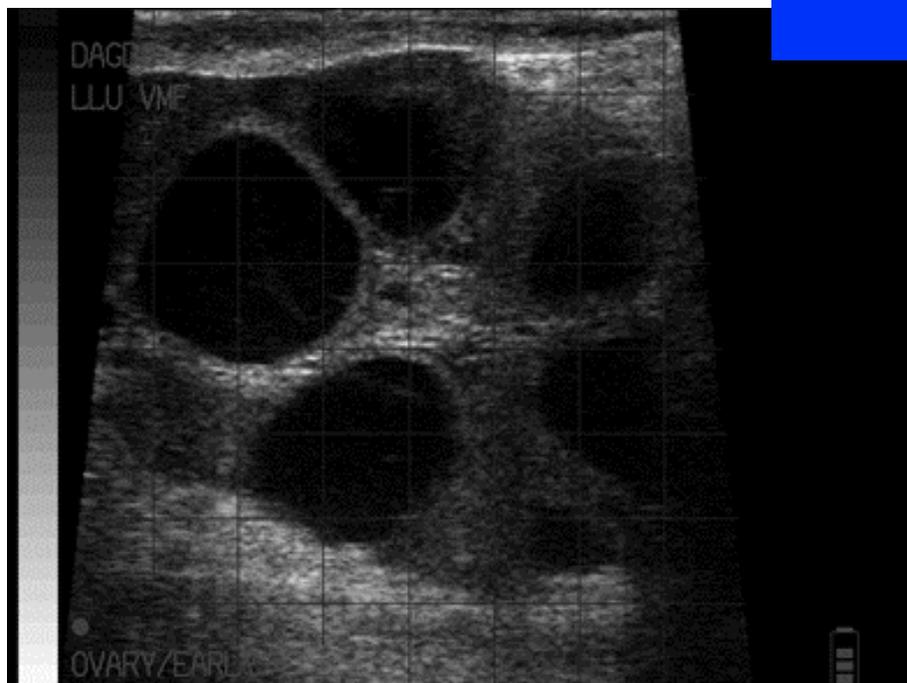
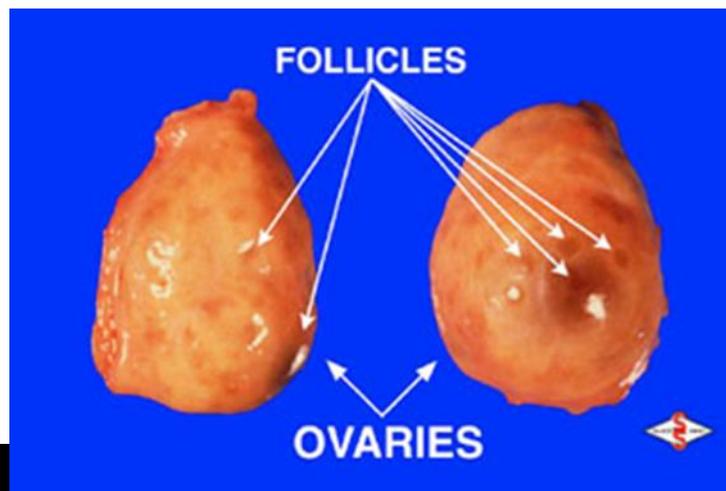






# Superovalācijas novērtēšana

- Manuāli
- USG
- Progesterona analīzes



# Donorgovs MA

- Divas devas – katrā ragā pa vienai
- Divas reizes
- Ja nepieciešams, MA trešo reizi



# EF ir kolektīvs darbs, kuram jā sagatavojas

Nepieciešams lietu klāsts, lai varētu veikt:

- embriju izskalošanu;
- asistēšanu;
- manipulācijas laboratorijā;
- dzīvnieka fiksēšanu (saimniecības personāls).

(Dzīvnieku īpašniekiem vai turētājiem ir pienākums nodrošināt dzīvnieku fiksēšanu veterinārmedicīnisko procedūru laikā (saskaņā ar Veterinārmedicīnas likuma 59.panta 2.punktu)

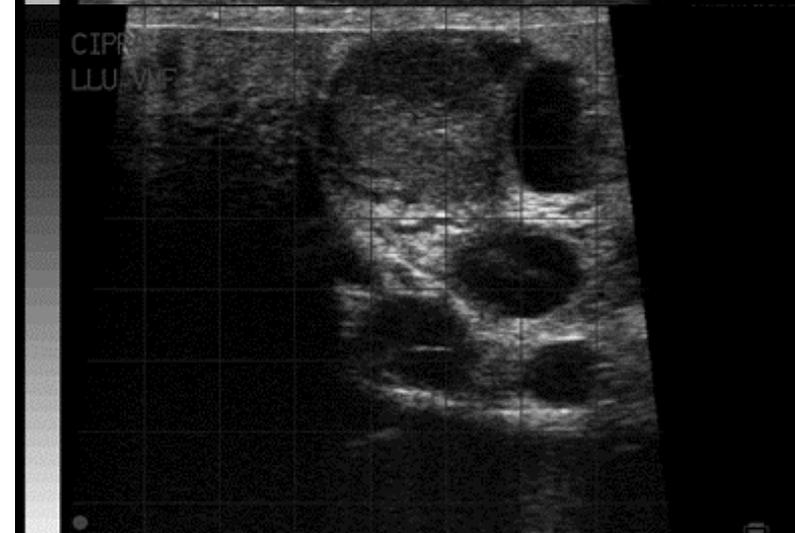
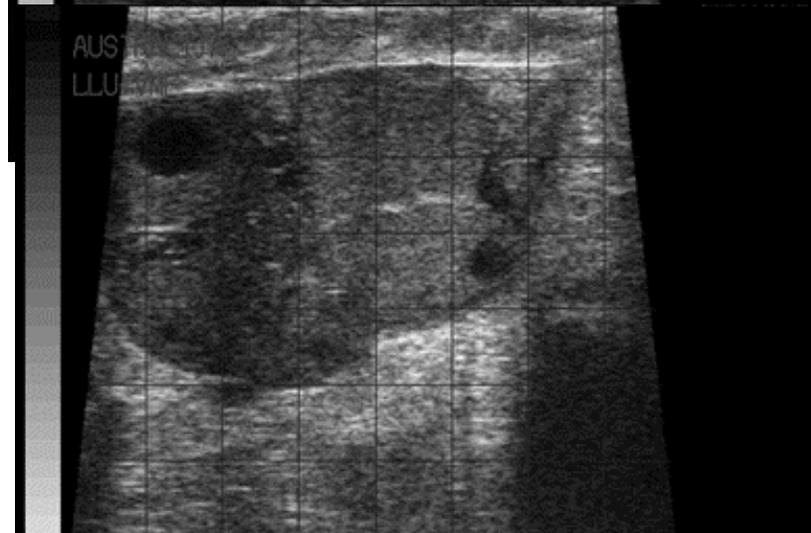
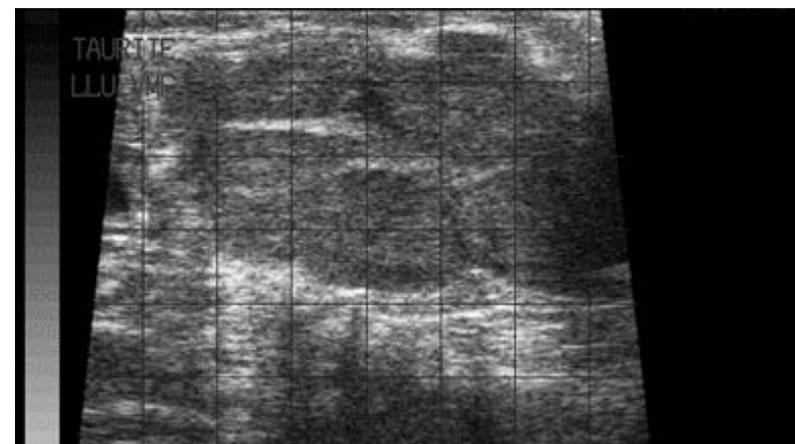
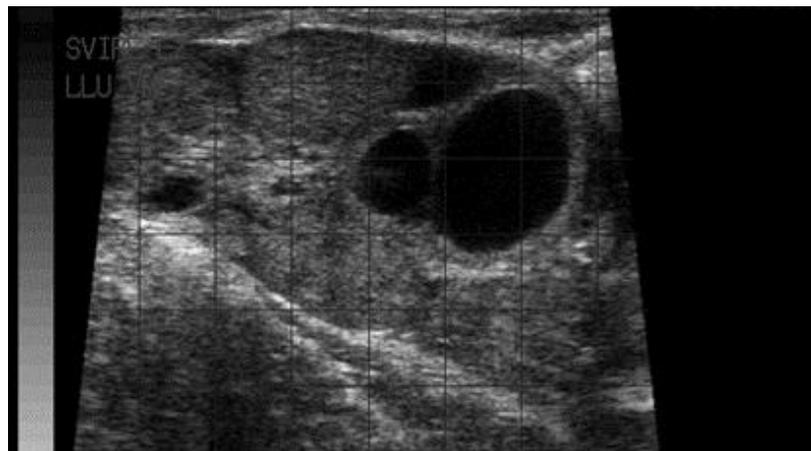


Aprīkojums, iekārtas, inventārs,  
medikamenti un citi līdzekļi  
dodoties uz EF un ET



# Embriju izskalošana jeb EF (*eng. embryo flushing*)

- Process sākas ar donorgovs sagatavošanu – izmeklēšanu manuāli, USG, lai pārlicinātos par CL klātbūtni un skaitu



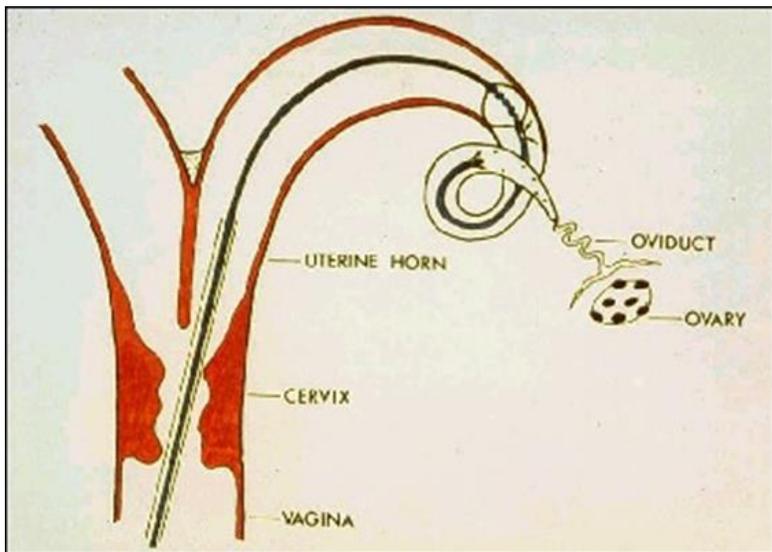
# Embriju izskalošanas procedūra

- Procedūras veikšanas vieta (fiksēšana, vides temperatūra; iekārtojums),
- Parasti 7 vai 8.dienā pēc donorgovs pirmās reizes MA;
- Aseptika, antiseptika;
- Epidurālā anestēzija;
- Īpaši instrumenti, katetri;
- Īpaši preparāti-vides šķīdumi;
- Īpaši apmācīts personāls.



# Embriju izskalošana I

Nepieciešams – embriju izskalošanas šķīdums, Foley katetri, vadu sistēma no embriju izskalošanas šķīduma līdz embriju uztvērējfiltram, uztvērējfiltrs, šļirce gaisa pievadei un atsūkšanai no baloniņa, saspiednes, cimdi u.c.



# Embriju izskalošana II



**BoviFreeze**  
Ethylene Glycol with Sucrose  
minitube

Freezing Medium for Bovine Embryos  
Einfriermedium für Rinderembryonen  
Medio para congelación de embriones bovinos

Ref. 19982/6052  
3 x 10 ml

Contains: 1.5 M ethylene glycol in a Zwitterion-buffered solution containing 0.1 M sucrose, D-glucose, Na-pyruvate, 0.4% BSA, amino acids, growth factors, vitamins, and antibiotics (Kanamycin and Gentamicin)

Procedure: Aliquot a small amount of media into a dish or well and place embryos to be frozen into medium using pipette technique. Equilibrate embryos for 3 to 10 minutes at room temperature prior to freezing.

Recommended storage: Store at +2°C to +4°C. Use entire contents of tube upon opening.

Do not use if solution is cloudy or yellow color, contains precipitates, or if tube is not sealed.

Warning: For veterinary use only. Keep out of reach of children. Not for human or animal consumption, injection or infusion.

Lot# 80191921702 Best By: 8.31.21



[https://www.youtube.com/watch?v=mIeEAN2FX5g&ab\\_channel=EmbryonicsLtd](https://www.youtube.com/watch?v=mIeEAN2FX5g&ab_channel=EmbryonicsLtd)



Embriju  
izskalošanas  
šķīdums



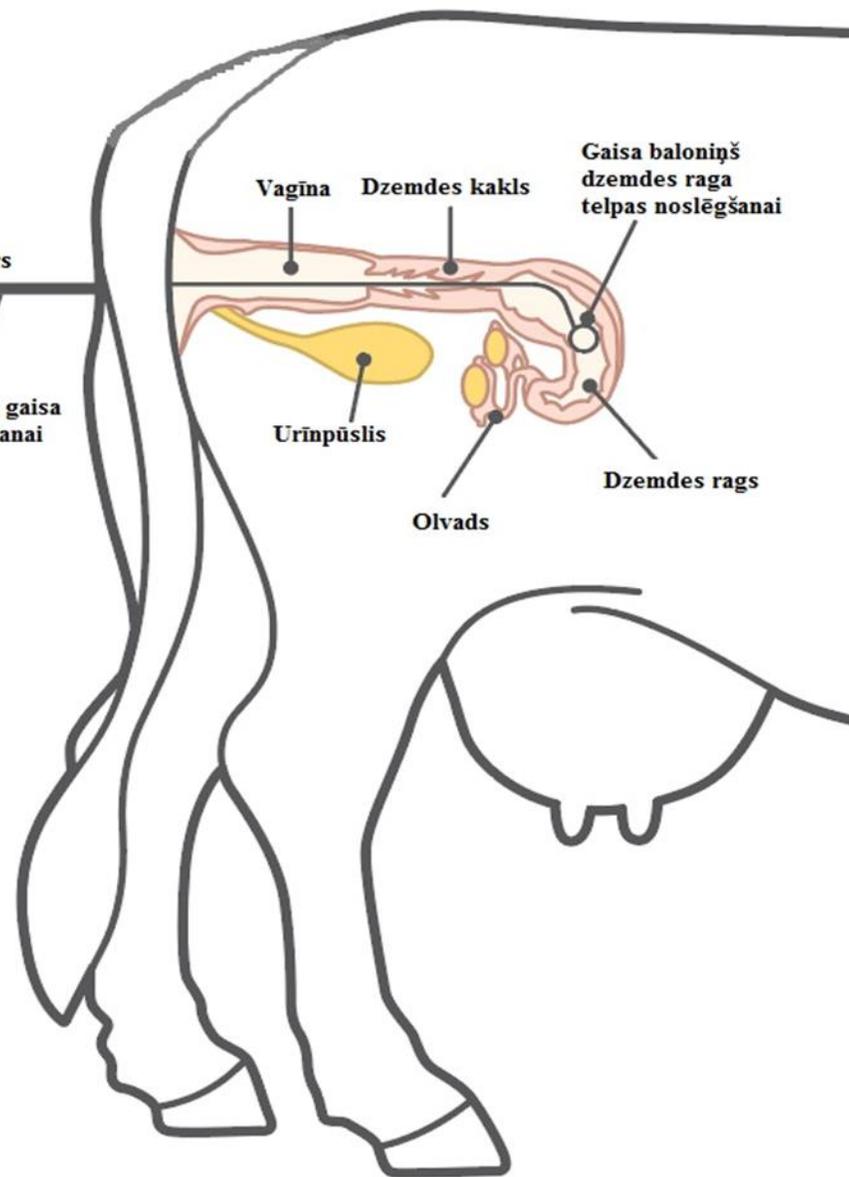
Foley katetrs

Atvere gaisa  
iepildīšanai

Embriju  
uztvērējfiltrs



vai sterils  
flakons





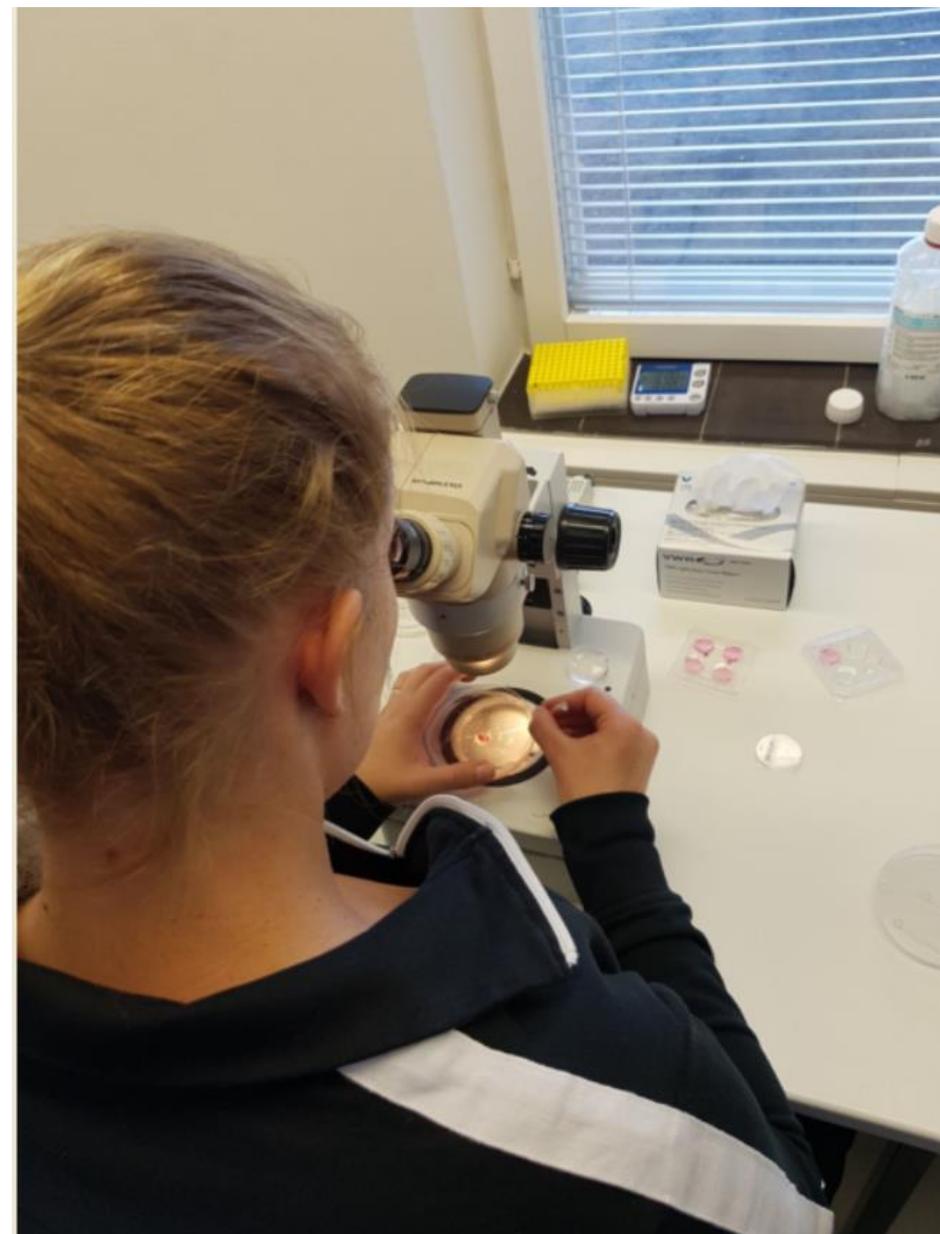
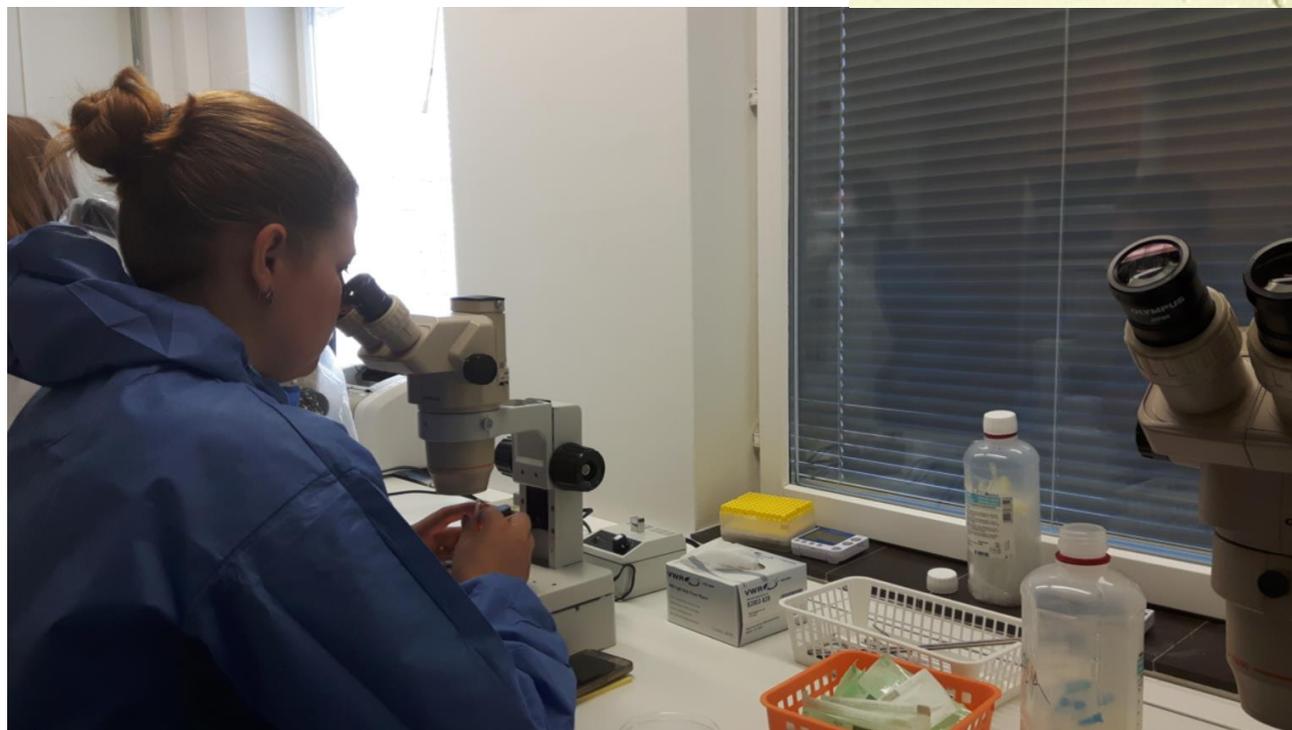
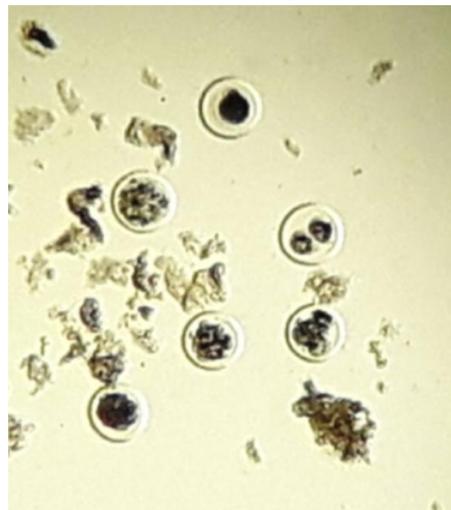
# EF Baisogala







# Laboratorijā



# Kas notiek laboratorijā:

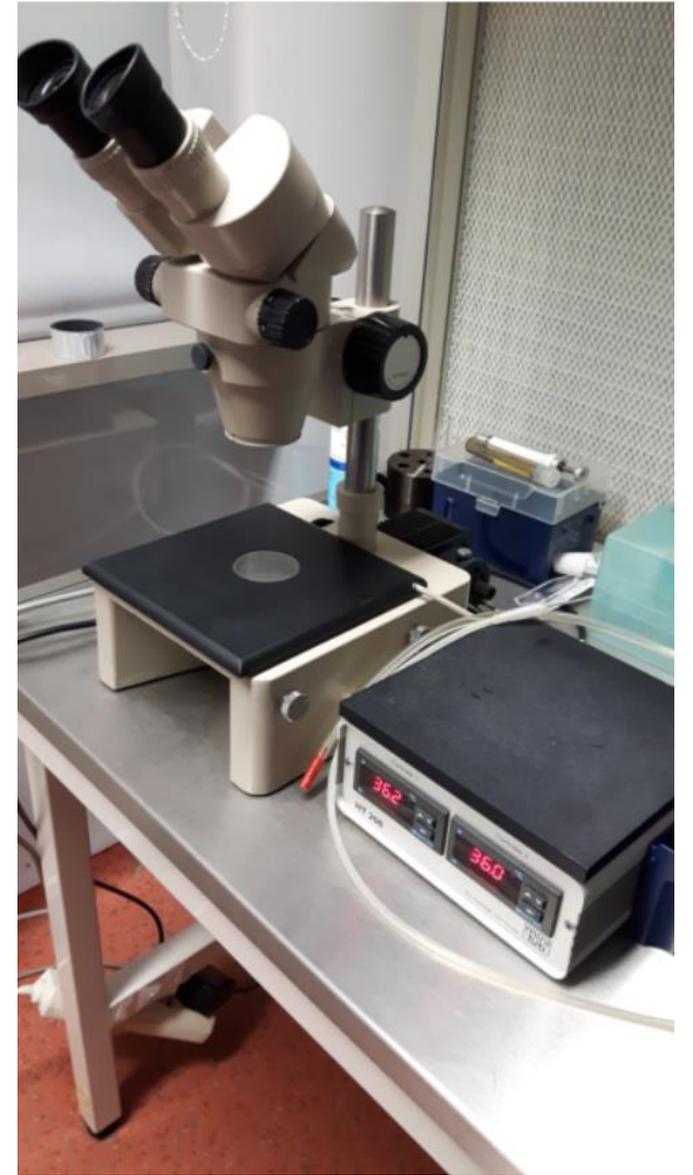
- Embriju atrašana
- Nomazgāšana
- Novērtēšana
- Iepildīšana pajetēs
- Sagatavošana ET
- Kriokonservācija



# Darbs mobilajā laboratorijā –

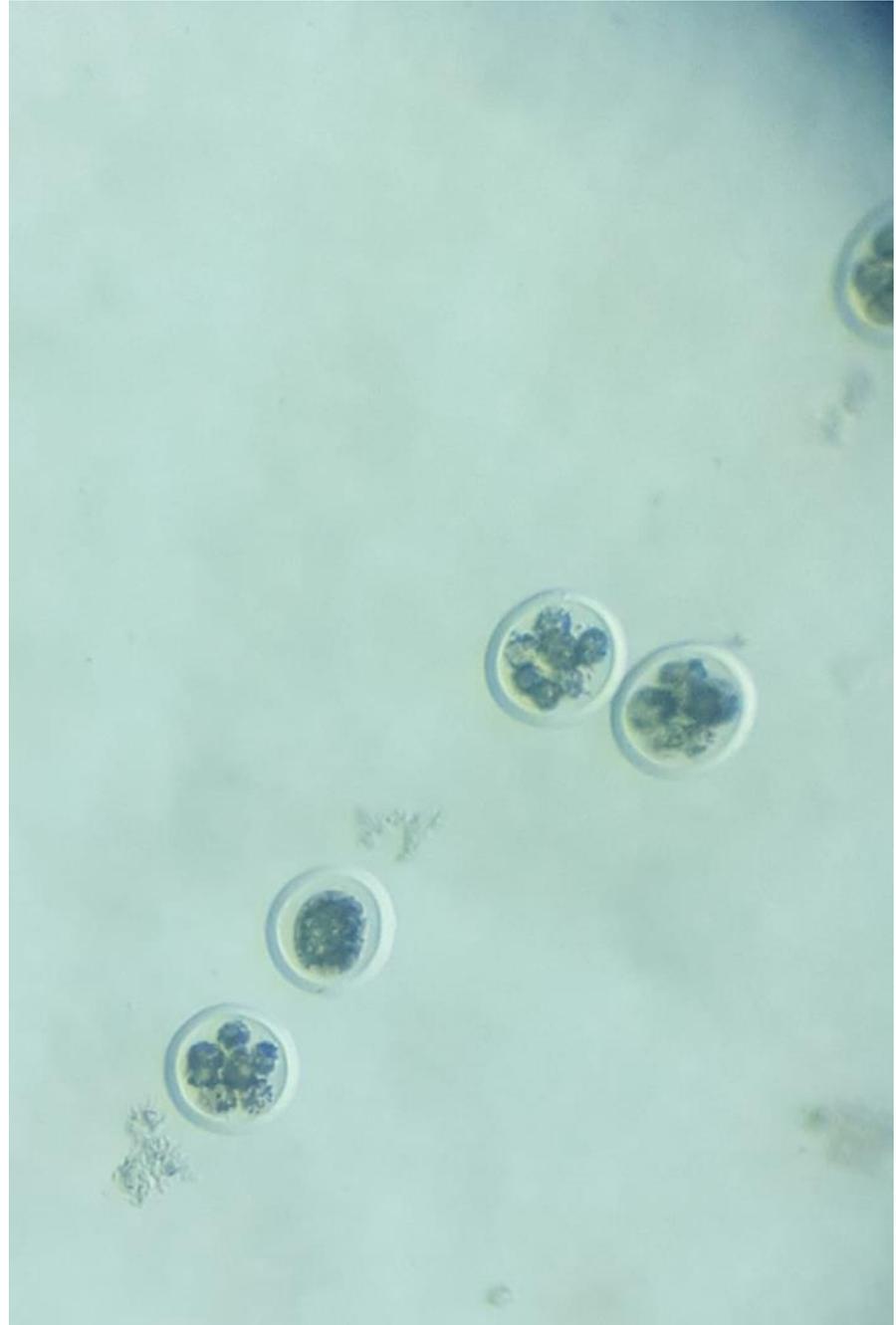
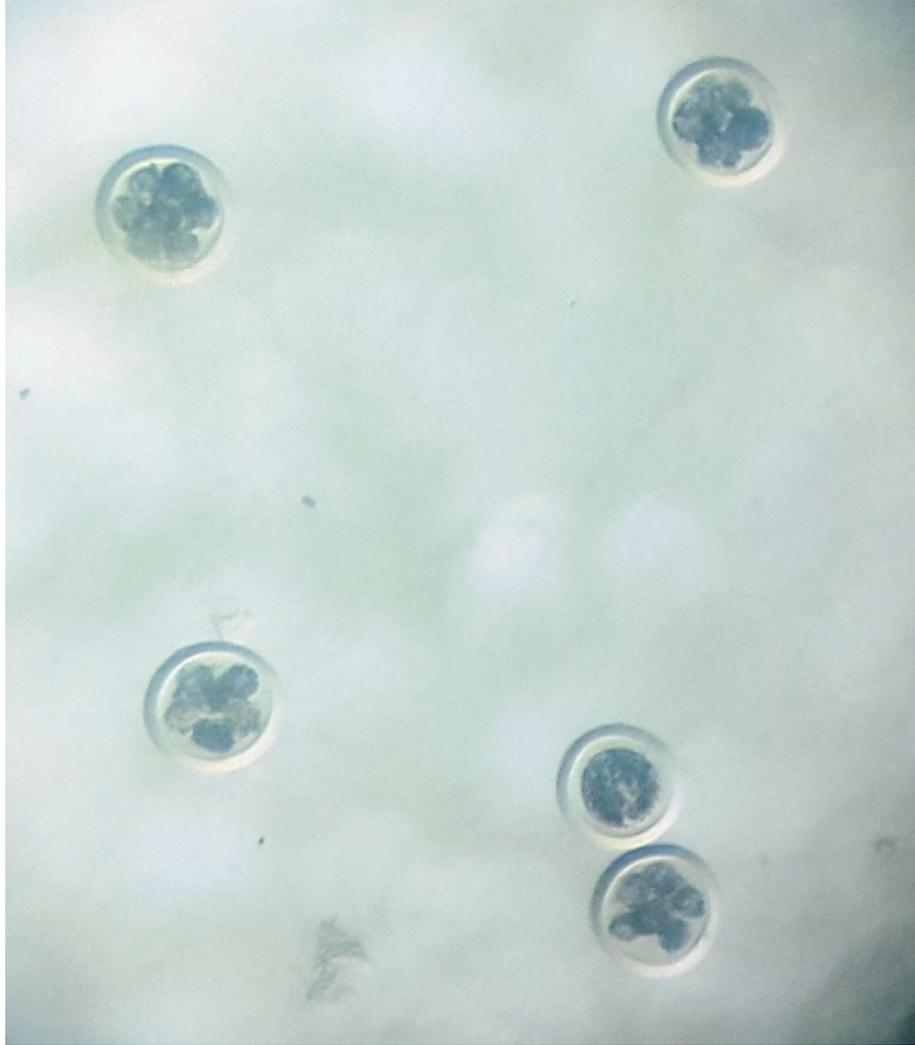




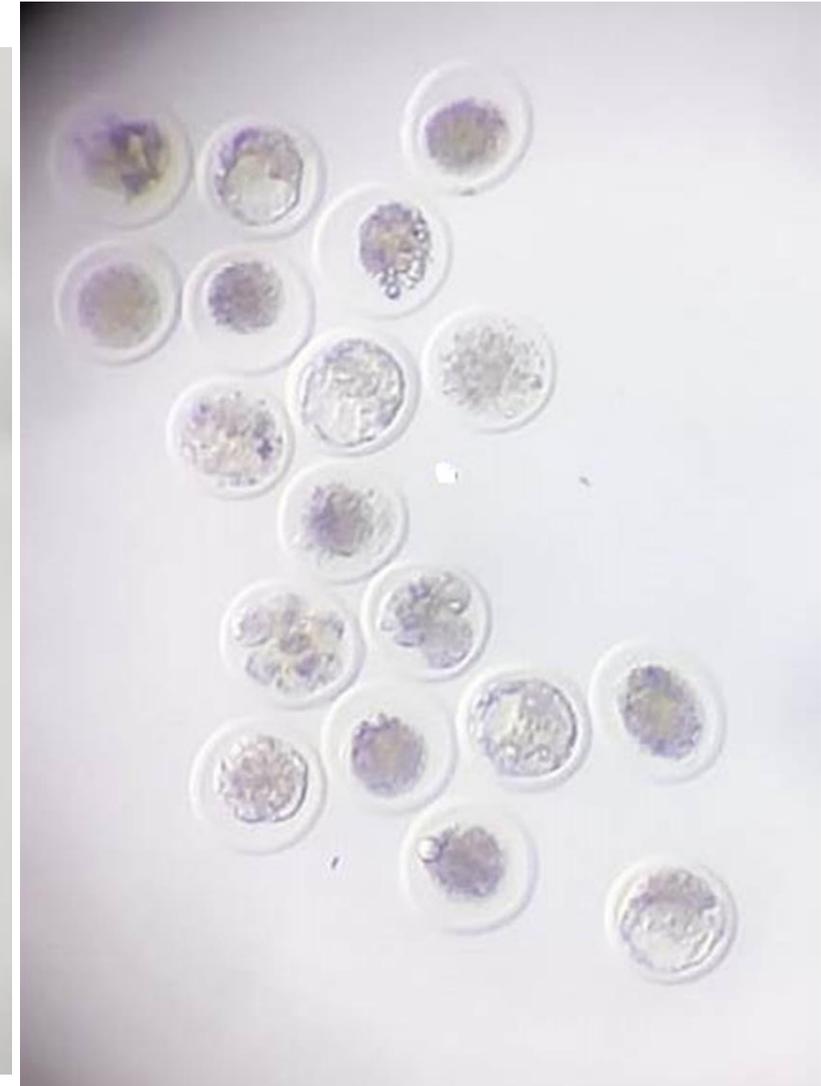
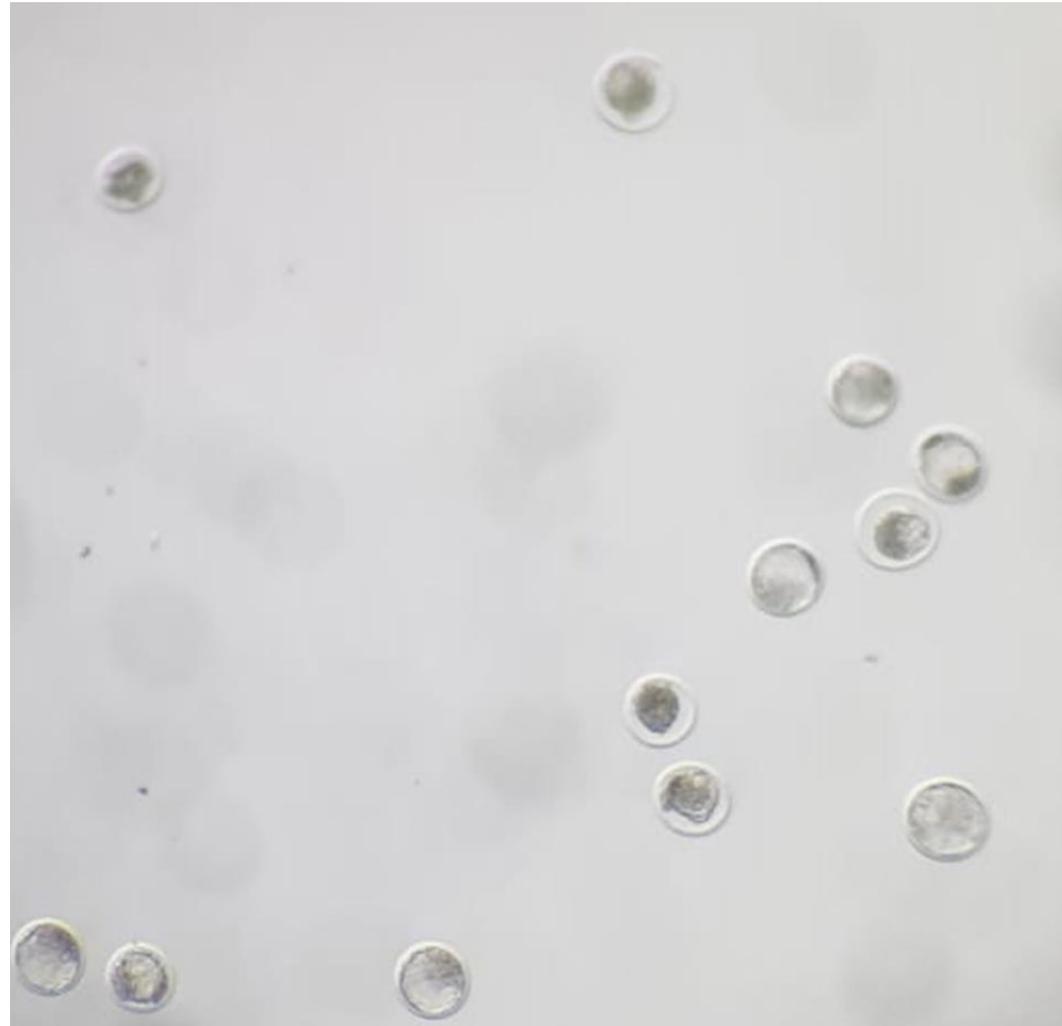
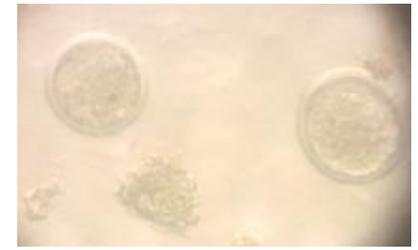


# Laboratoriskās manipulācijās svarīgi:

- **Jāsaglabā temperatūra!**
- Jārīkojas maksimāli ātri
- Mainot vides neizraisīt temperatūras svārstības, kad embrijus no EF vides pārnes uz glabāšanas vidi novērtēšanai
- Embriju iepildīšana pajetēs. Ja dziļai asaldēšanai, tad etilēnglikolu saturošā vidē ne ilgāk par 5 min.
- Embriju pārvešana sinhronizētos recipientos – saglabāt temperatūru, kamēr tiek līdz recipientiem
- Embriju kriokonservācija
- Atkausējot – ET jāveic 5 min laikā, neradot termošoku



# Embriju attīstības stadija un kvalitāte



# Embrija attīstība

Attīstības stadija	Dienas pēc oestrus
1 šūna	0-2
2 šūnas	1-3
4 šūnas	2-3
8 šūnas	3-5
16 šūnas	4-5
Agrīnā morula	5-6
Morula	5-7
Agrīnā blastocista	7-8
Blastocista	7-9
Paplašinājusies blastocista	8-10



1-cell



2-cell



8-cell



16-cell



Morula



Compacted morula



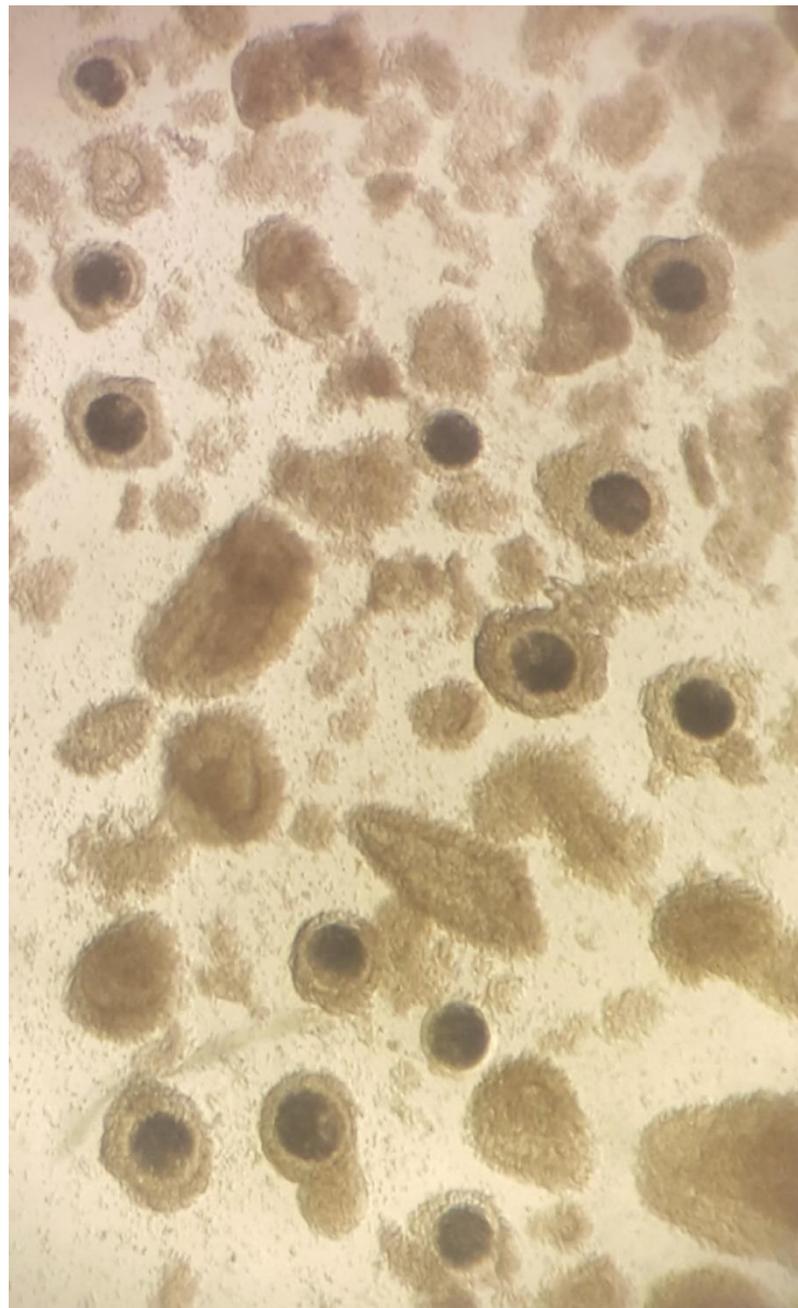
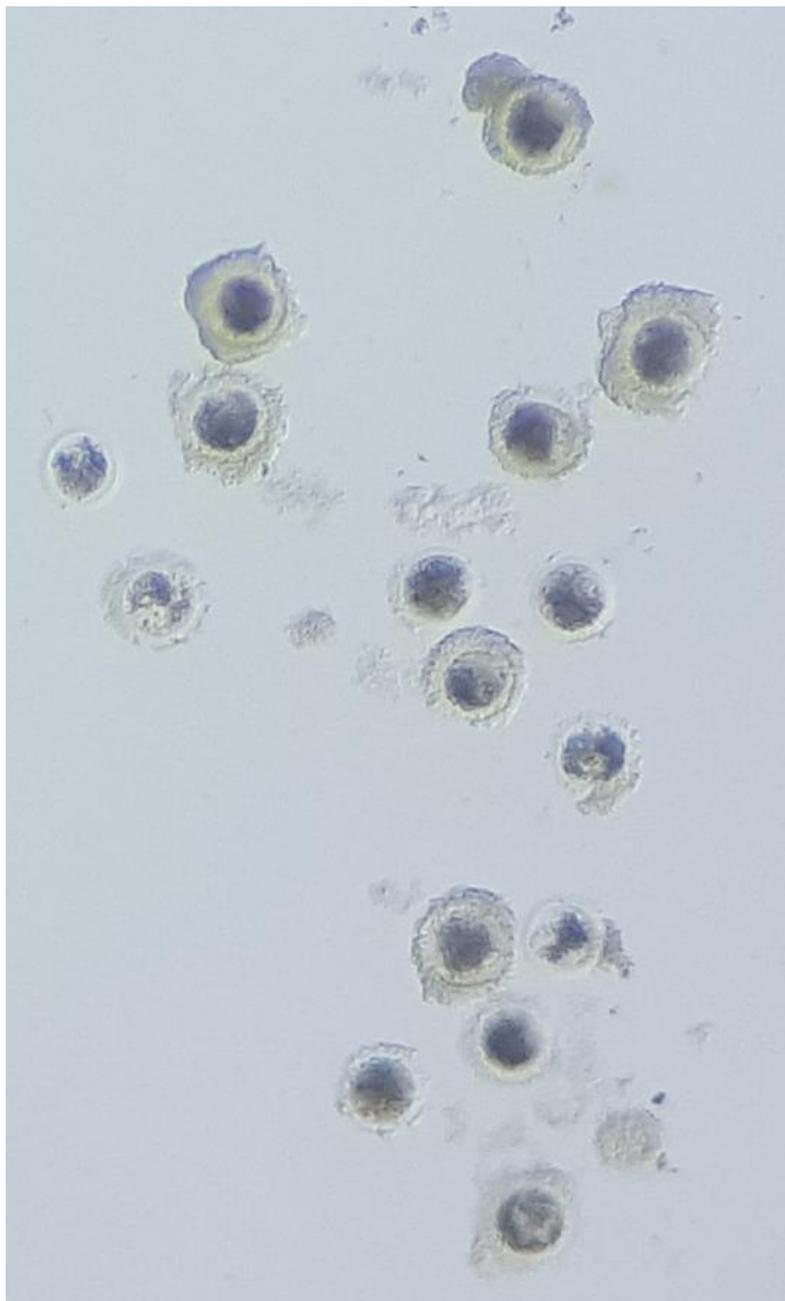
Early blastocyst



Blastocyst



Expanding blastocyst



# OPU/IVF procesa etapi:

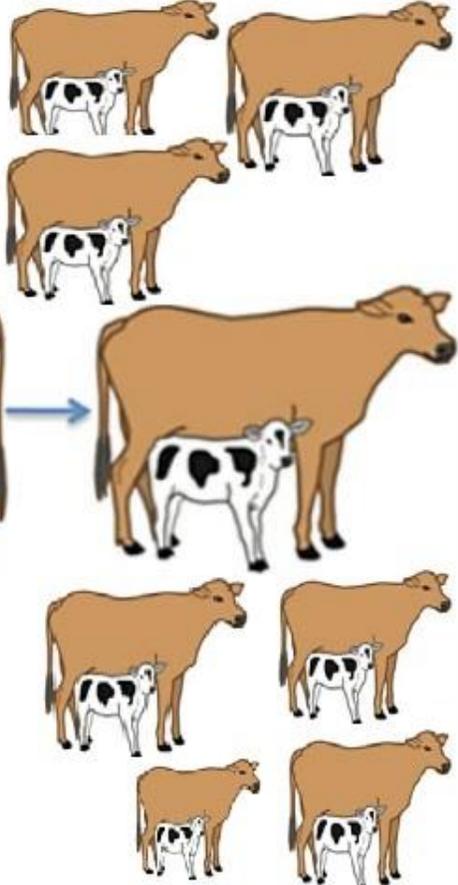
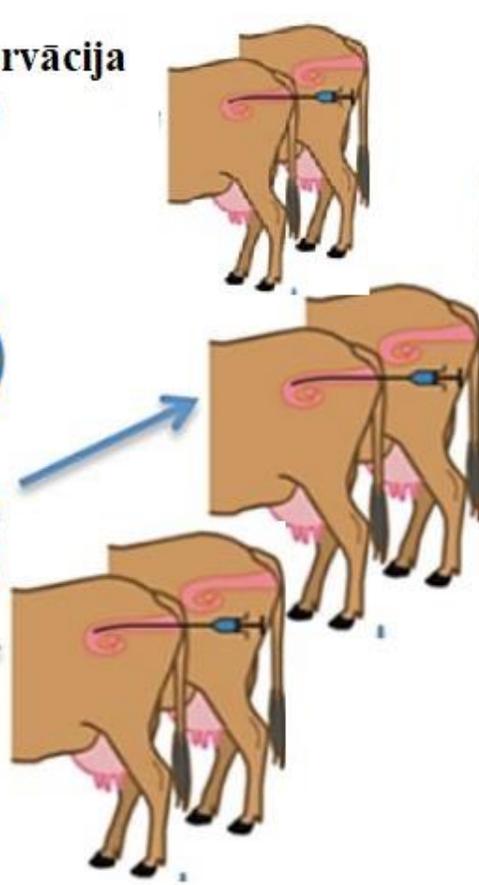
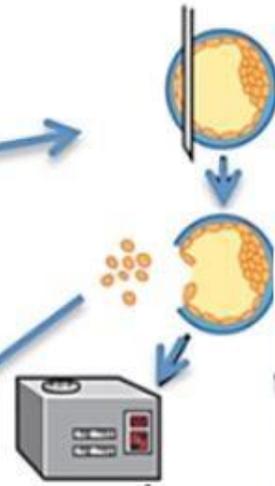
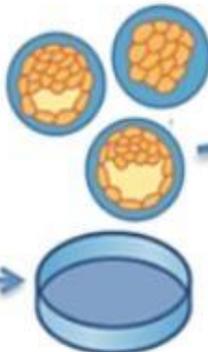
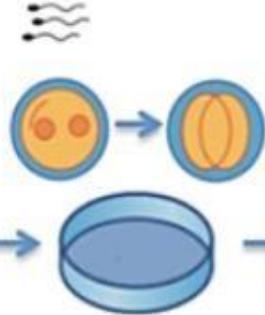
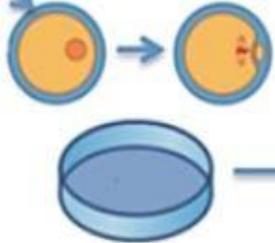
Oocītu aspirācija  
OPU

Nobriedināšana  
IVM

Fertilizācija  
IVF

Kultivēšana  
IVC

ET vai  
krioprezervācija  
(biopsija)

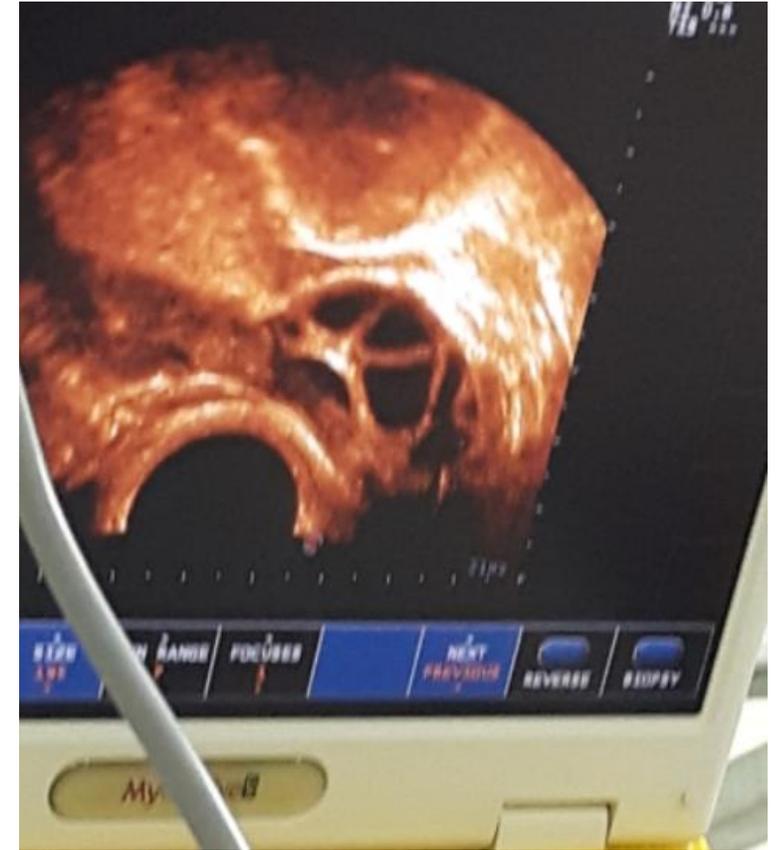


# OPU/IVF – olšūnas var iegūt:

- kautuvē



# OPU/IVF – olšūnas var iegūt: no donorgovs



attēlā: OPU Viking Genetics



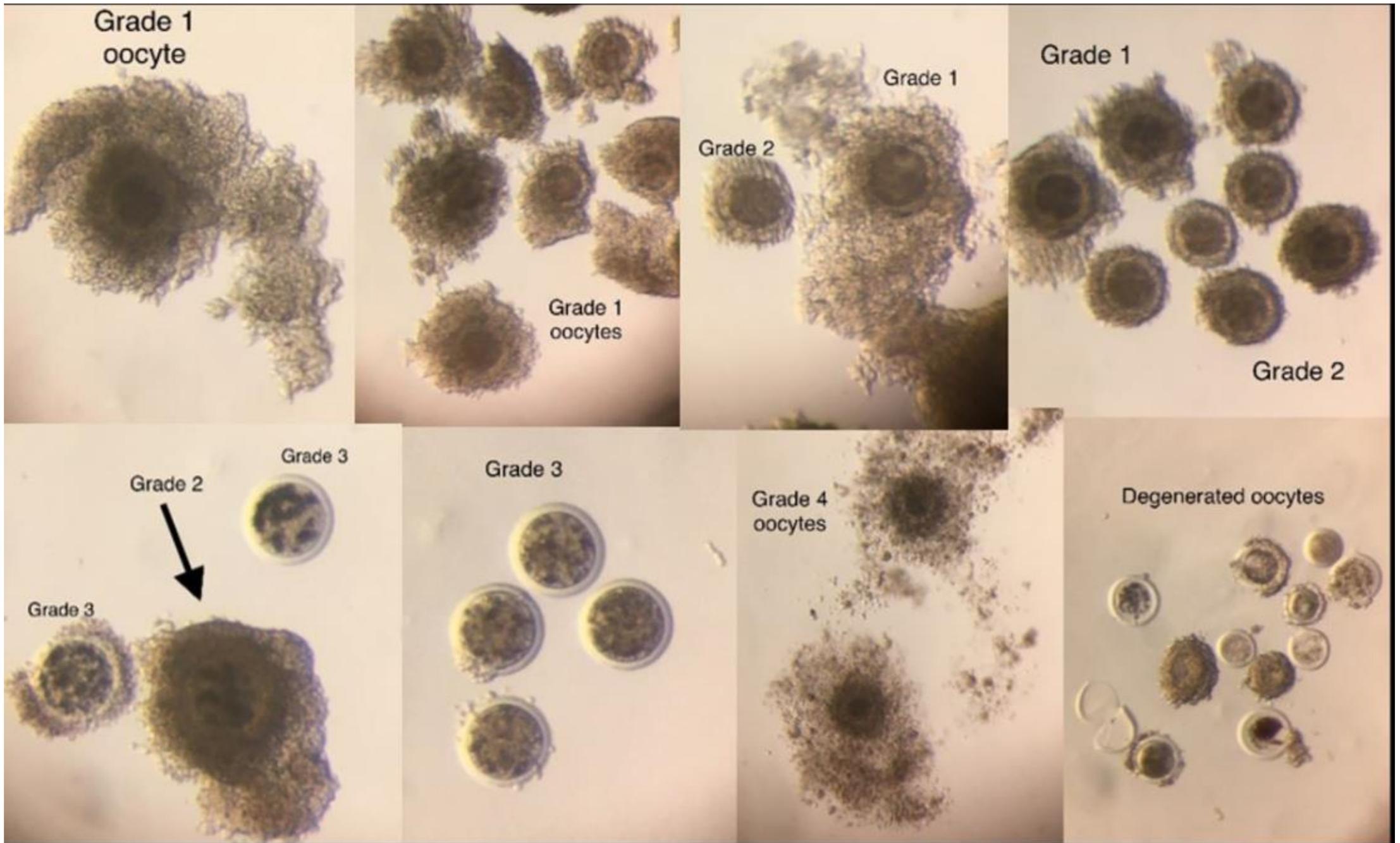


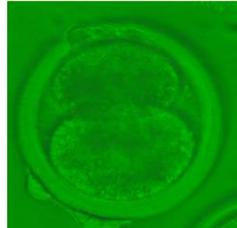
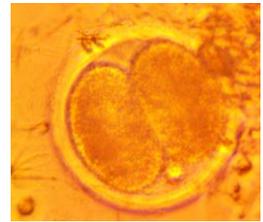
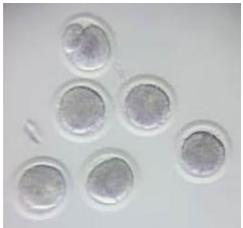
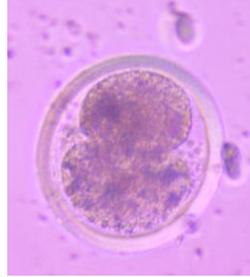
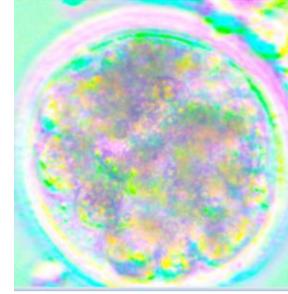
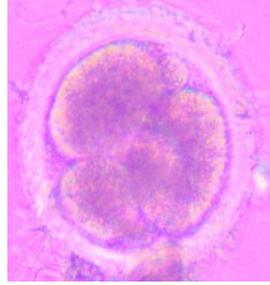
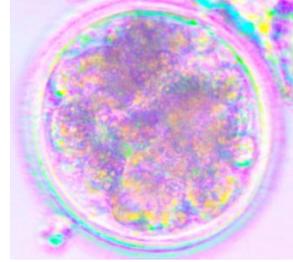
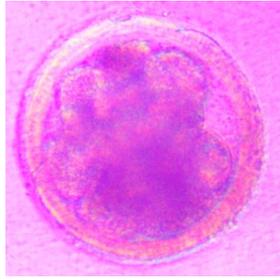


**OPU Tartu**

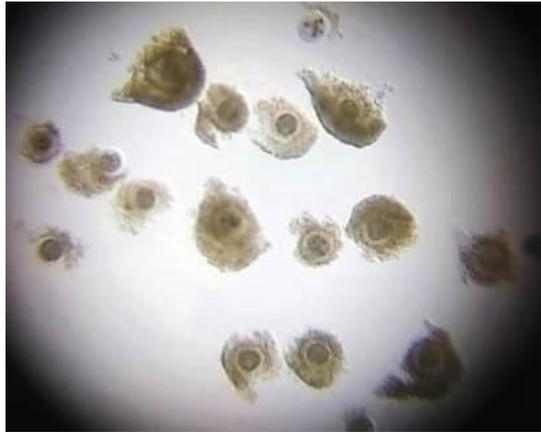
# Apstākļi mūsu saimniecībā







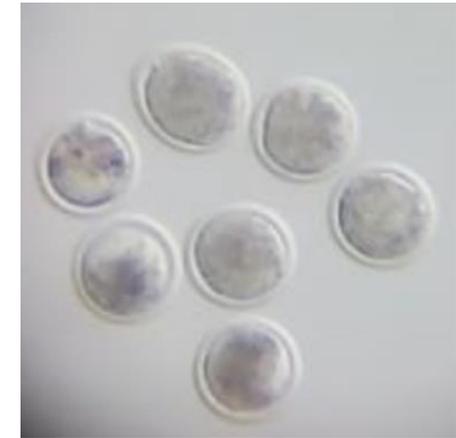
# IVM, IVF, IVC



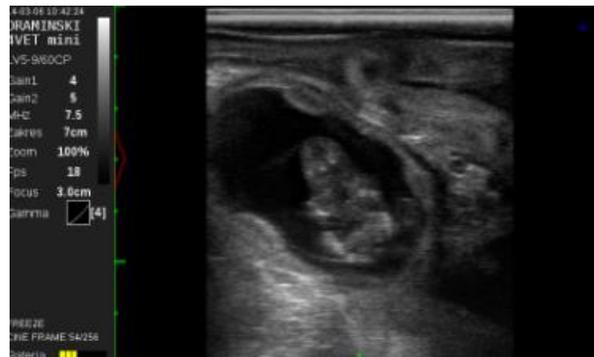
0. diena



1.diena



2.diena. Potenciālās zigotas

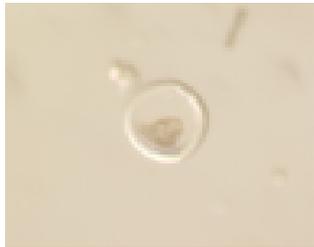


<https://www.farmtechsolutions.com/products/training-support/livestock-ultrasound-images/>

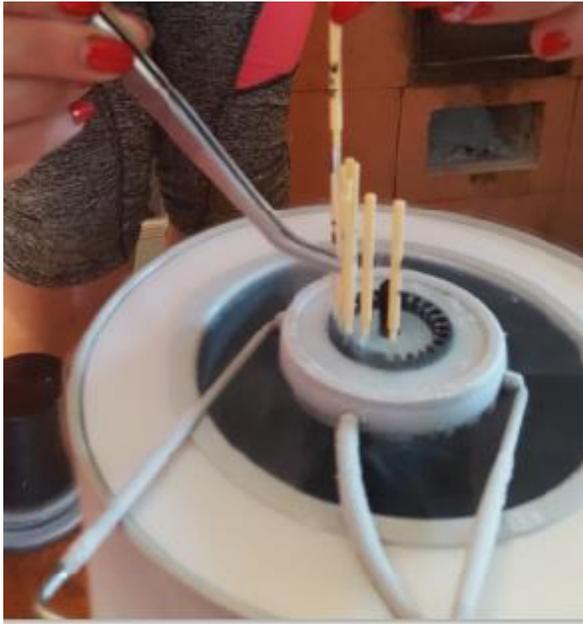


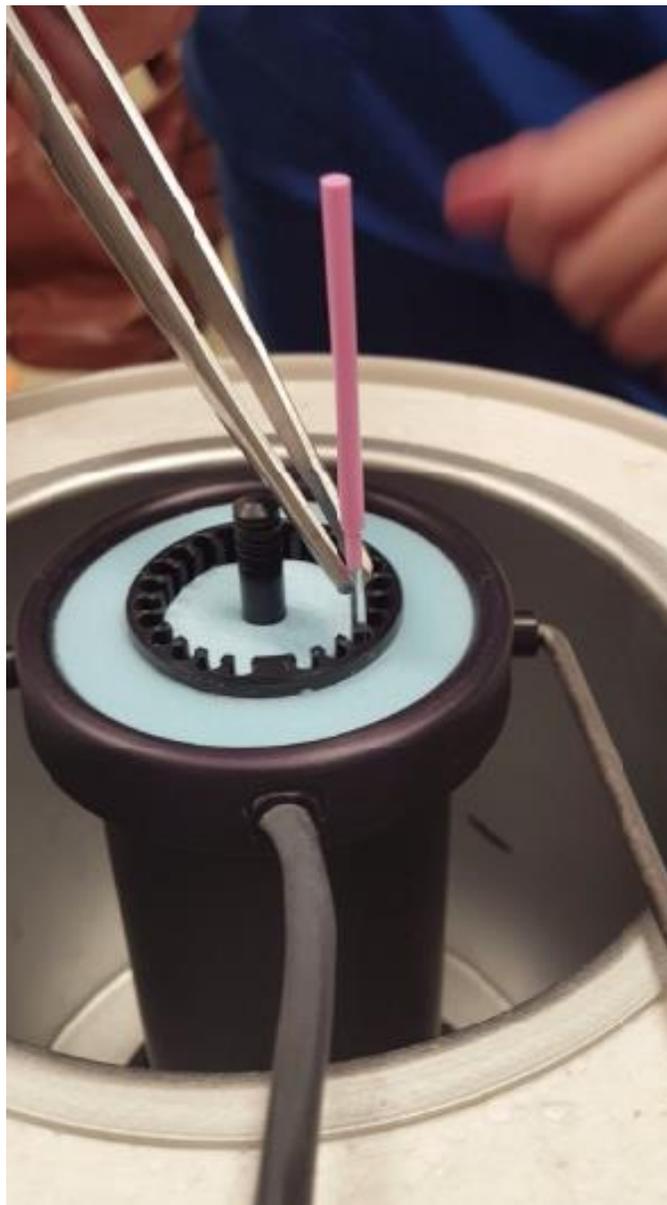
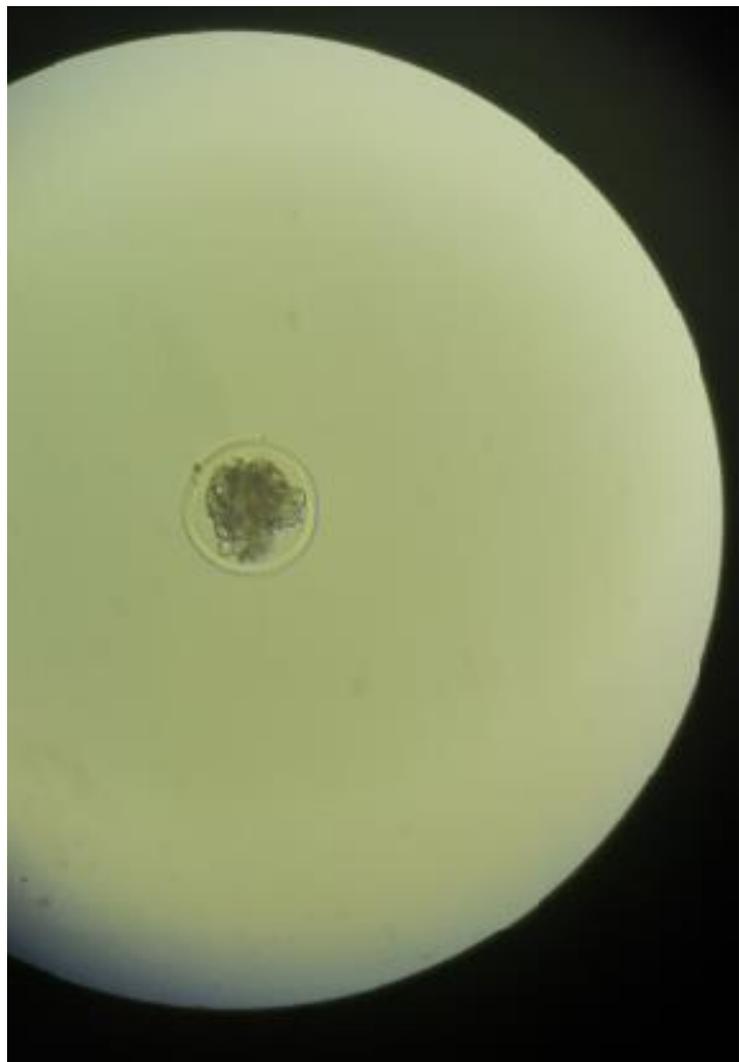
8.diena, embriji 7 dienas veci

# Embriju kriokonservācija



12.06.2018.  
4-1+1+1  
6-1+1+1+1  
4-3+1+1  
4-2+1+1  
9 EMBRYOS  
LZ SVĪRE  
9764





# Recipienti

- Ģenētiskajai kvalitātei nav nozīmes
- Jābūt veselam
- Jābūt sinhronam dzimumciklam ar donoru
- Dzimumcikla dienai jāatbilst embriju vecumam
- Jāfiksē
- Jāizmeklē, vai ir kvalitatīvs CL
- Epidurālā anestēzija

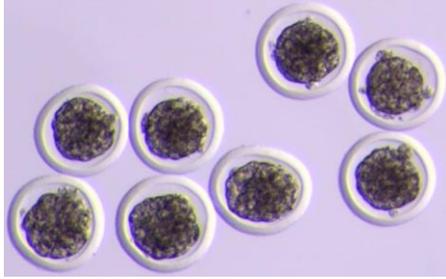


Telei vaginīts. Vai var būt par recipientu?

# MOET vs OPU/IVF



## MOET



1. reizi 2 mēnešos
2. darbietilpīga donora sagatavošana
3. pagarinās laktācija
4. nevar izmantot grūsnu govi
5. hormonu preparātu protokoli MO
6. embriji izturīgāki
7. speciālistu kvalifikācija
8. 3-6 transferabli embriji (4-5)
9. mazāks pieejamo recipientu skaits
10. vidēji 1 EF 3-5 spermas devas
11. vienā MO - viens bullis
12. grūsnība vidēji 50% un vairāk
13. invazīvāks, jo izmanto dzemdi
14. mobila laboratorija
15. tikai no dzīvas donorgovs

## OPU/IVF



1. reizi 2 nedēļās (pat biežāk)
2. nevajag sagatavot/minimāli
3. neietekmē laktāciju
4. var izmantot arī grūsnu govi
5. +/- stimulēt folikuloģenēzi
6. embriji ļoti jutīgi
7. augsta speciālistu kvalifikācija
8. 3-4 x vairāk embriju nekā MO (8-12)
9. lielāks recipientu skaits vienā reizē
10. vienas sesijas oocītiem - 1 spermas deva
11. vienas OPU oocītus var IVF ar dažādu buļļu spermu
12. grūsnība 45% (bet kļūst labāk!)
13. mazāk invazīvs, jo neizmanto dzemdi
14. dārgas laboratoriskās iekārtas
15. var iegūt oocītus kautuvē

# Sezonas nozīme

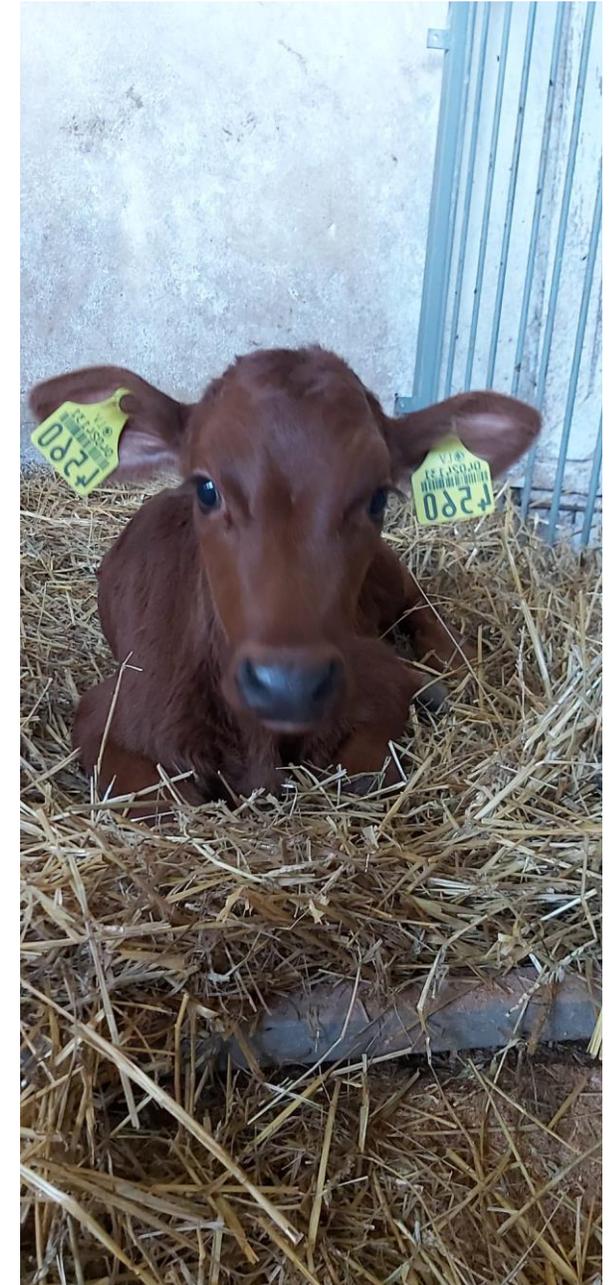


# LLU VK



Lauksaimniecības dzīvnieku klīnika

# 1. MOET ceļā iegūtais pēcnācējs



**Paldies par  
uzmanību!**

**Jautājumi?**

