

# Wstępny wiadomości o biotechnologii rozrodu zwierząt i człowieka



dr R. Faúndez

Zakład Rozrodu Zwierząt, Andrologii i Biotechnologii Rozrodu  
Katedra Chorób Dużych Zwierząt z Klinika  
Wydział Medycyny Weterynaryjnej SGGW  
Laboratorium Biotechnologii WCB & CBB

# Biotechnologia Rozrodu

## Procedury Klasyczne

- # Kontrola funkcji rozrodczych
  - Sterowanie cyklu i rui
  - Indukcja zakończenia porodu
  - Indukcja pokwitania i rui
  - Superowulacja
  - Antykoncepcja
- # Sztuczne unasienianie
- # Przenoszenie zarodków (Embryo Transfer – ET)
- # Konserwacja gamet i zarodków w niskich temperaturach (Kriokonserwacja)

# Biotechnologia Rozrodu

## Procedury Zaawansowane

- # Produkcja zarodków *in vitro* (IVP)
- # Techniki Wspomagane Rozrodu – ART
- # Mikromanipulacja gamet i zarodków
- # Przedimplantacyjna Diagnostyka genetyczna – PGD, PGS, NGS
- # Witryfikacja gamet, zarodków i tkanek narządów rozrodczych w niskich temperaturach
- # Klonowanie
- # Produkcja zwierząt transgenicznych
- # Stosowanie zarodkowych komórek macierzystych
- # Transfer mitochondrialny
- # Nanotechnologia rozrodu

# Biotechnologia Rozrodu

## Diagnostyka laboratoryjna

- # Standardowa analiza nasienia
- # Analiza nasienia wspomagana komputerowo (CASA)
- # Morfologiczna analiza organelli plemnika (MSOME)
- # Analiza hormonalna
- # Diagnostyka chorób zakaźnych
- # Diagnostyka ciąży
- # Diagnostyka laboratoryjna niepłodności
  - Diagnostyka genetyczna
  - Próby funkcjonalne plemników
  - Wskaźniki funkcji jajników
  - Badanie zdolności oocytów do zapłodnienia
- # Analiza podatności endometrium do implantacji zarodków ERA - Test (Endometrial Receptivity Analysis)



# Techniki wspomaganego rozrodu (ART)

## Pierwotne techniki

---

- # Inseminacja homologiczna (AIH) i heterologiczna (AID)
- # Pozaustrojowe zapłodnienie i transfer zarodka IVF-ET
- # Dojajowodowe przeniesienie gamet (GIFT)
- # Transfer zygoty do jajowodu (ZIFT)
- # Transfer zarodków do jajowodu (TET)
- # Zapłodnienie wspomagane mikrochirurgiczne
  - Zona Drilling (ZD), Partial Zona Drilling (PZD), Subzonal insemination (SUZI)

# Techniki wspomaganego rozrodu (ART) zaawansowane techniki

- # Dojrzewanie oocytów in vitro (IVM)
- # Hodowla zarodków do stadium blastocysty (IVC)
- # Zapłodnienie wspomagane mikrochirurgiczne
  - # Docytoplazmatyczna Iniekcja Plemnika do Oocytu (ICSI)
  - # Docytoplazmatyczna Iniekcja Dobranych Plemników do Oocytu (IMSI)
- # Darowanie oocytów – OD i zarodków (ED)
- # Poklatkowa rejestracja rozwoju zarodków (Time Lapse Monitoring of Embryo Development - TLMED)

# Techniki mikrochirurgiczne do wspomaganego zapłodnienia

## # Pozyskiwanie plemników

- Testicular Sperm Aspiration (TESA)
- Microsurgical Epididymal Sperm Aspiration (MESA)
- Percutaneous Epididymal Sperm Aspiration (PESA)
- Round Spermatozoa Injection (ROSI)
- Elongated Spermatozoa Injection (ELSI)

# Zaawansowane techniki embriologii klinicznej i doświadczalnej

- # Genetyczna diagnostyka przed implantacyjna (PGD)
- # Transfer jąder komórkowych (NT)
- # Transfer cytoplazmy (CT)
- # Transfer mitochondrii
- # Hodowla in vitro tkanek gonad
- # Ksenotransplantacja gamet
- # Wspomagane wylęganie się zarodka z osłonki przejrzystej AZH
- # Witryfikacja zarodków, plemników, oocytów i tkanek jajnikowych
- # Produkcja chimer



# Metody selekcji plemników do procedur IVF, ICSI i IUI

## # Techniki migracji plemników

- Swim – Up z nasienia i plemników
- Swim – Down
- Migracja i Sedymentacja

## # Techniki selektywnego płukania nasienia

### ➤ Stopniowe Gradient Gęstości

- ❖ Percoll
- ❖ Sperm Grad
- ❖ SupraSperm
- ❖ PureSperm
- ❖ Sperm Filter

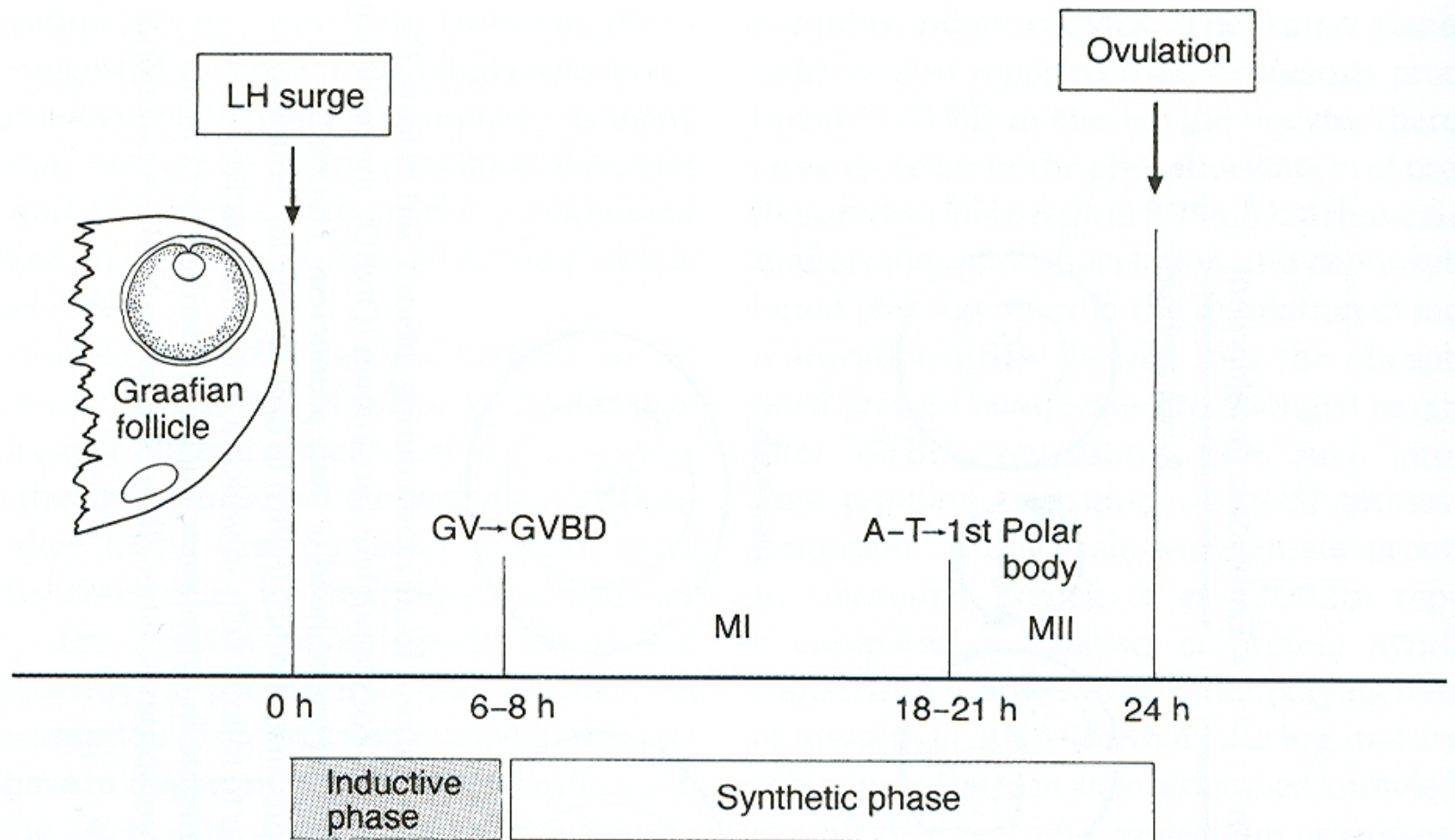
Koloidalna zawiesina  
cząsteczek krzemionki  
pokrytych sylanem

# Produkcja zarodków in vitro IVP

- # IVM - Dojrzewanie *in vitro*
- # IVF - Zapłodnienie *in vitro*
- # IVC - Hodowla zarodków *in vitro*
- # ET - Przenoszenie zarodków
- # IVMFC- IVM+IVF+IVC

# Dojrzewanie *in vitro* IVM





**Fig. 4.4.** Chronology of events during oocyte maturation in the cow. GV, germinal-vesicle oocyte; GVBD, germinal-vesicle breakdown; MI, metaphase I; A-T, anaphase–telophase; MII, metaphase II.



# Dojrzewanie oocytu

---

- # Owulacja
- # Dojrzewanie jądrowe i cytoplasmatyczne
- # Zmiany biochemiczne i fisiologiczne

# Dojrzewanie oocytu

## #Owulacja

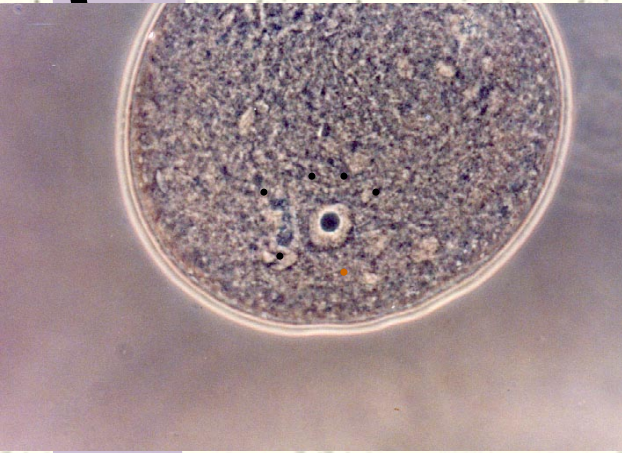
- Pęcherzyk dominujący ( $> 8$  mm)
- Wzrost częstotliwości pulsacji LH
- Zmiany ultrastrukturalne oocytu

# Metody dojrzewanie oocytów *in vitro*

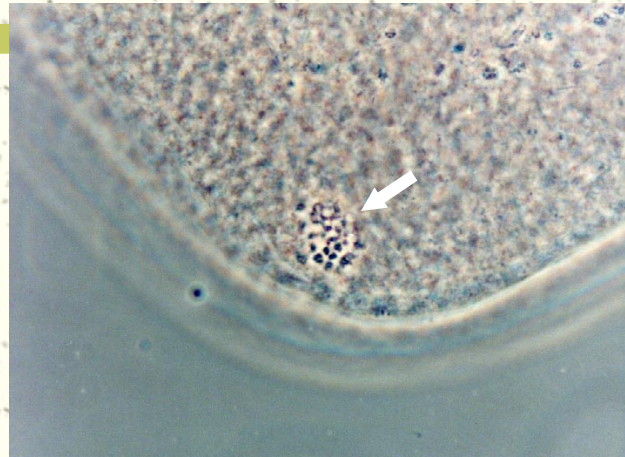
- # Hodowla w prostych i złożonych chemicznie zdefiniowanych płynów do hodowli
- # Hodowla izolowanych pęcherzyków jajnikowych
- # Współhodowla z komórkami somatycznymi
- # Hodowla w płynach w których przednio hodowano komórki somatyczne ( preconditioned media)



# IVM (bydło)



**GVBD**



**MI**



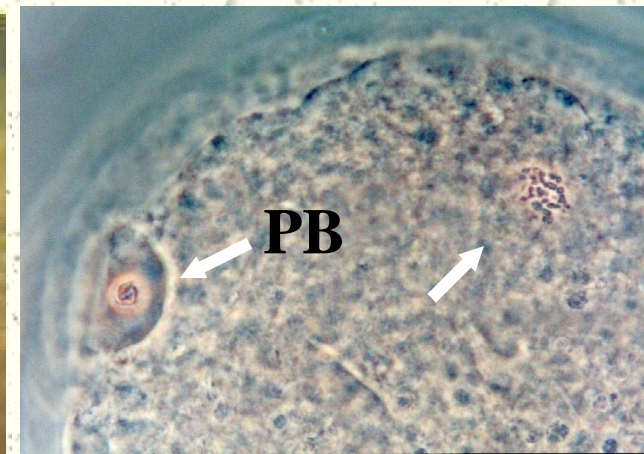
**Anaf. I**



**Telof. I**

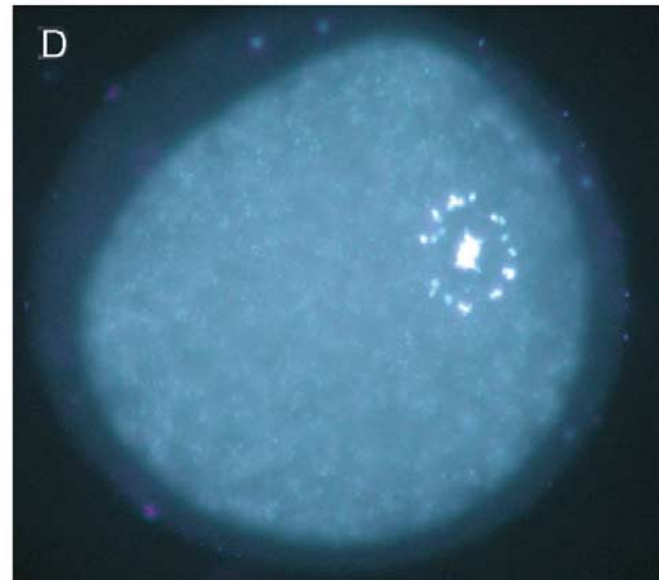
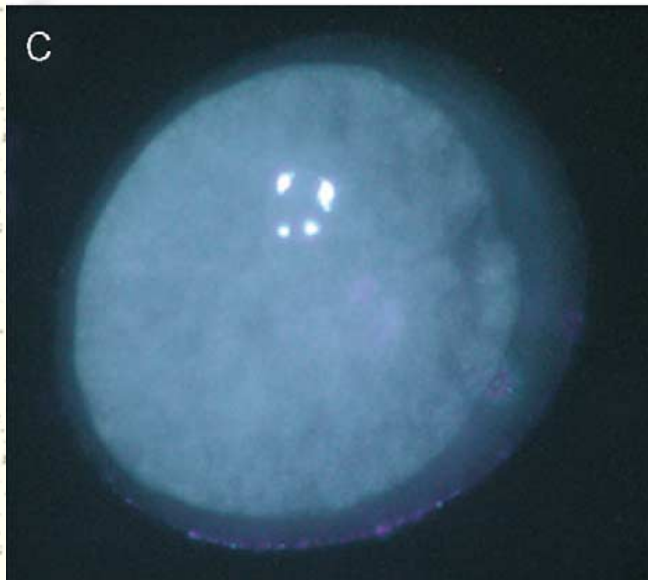
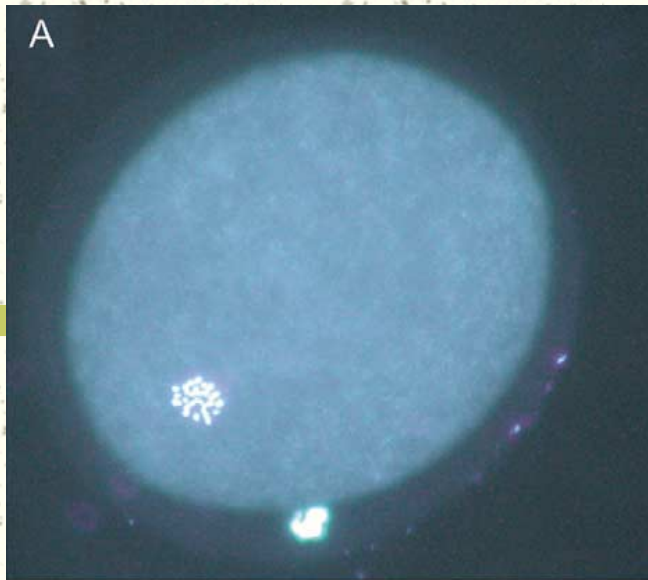


**M II**



**M II**

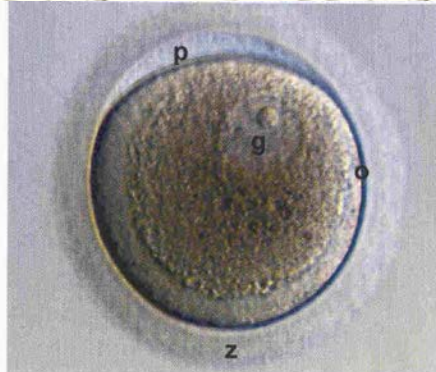
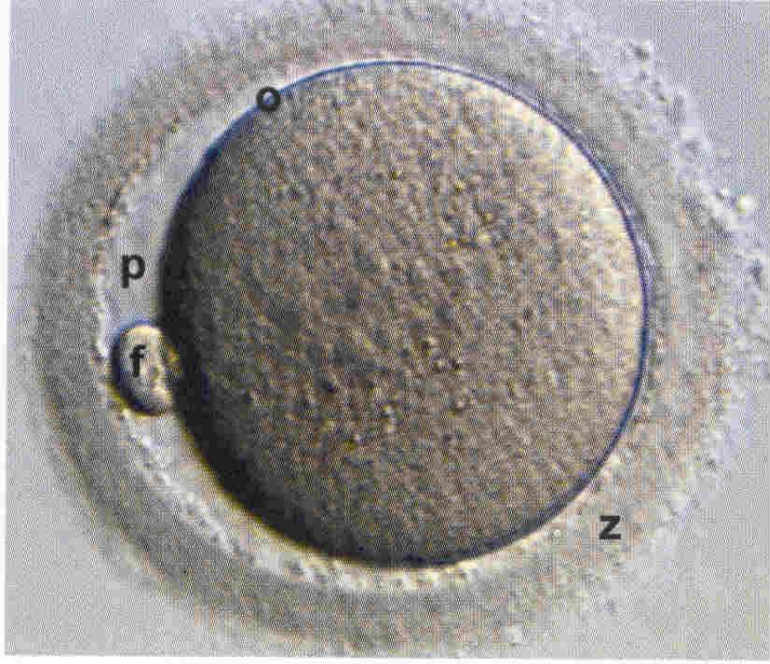




A = Metafaza II normal

B, C, D = Metafaza II nieprawidłowa







## Płyn do dojrzewania oocytów bydłęcych

**TCM 199 Hepes (Sigma)**

**FCS**

**Antybiotyk antymikotyk (Antibiotic antimycotic solution 100X Sigma)**  
100 j.m/ml penicyliny, 100  $\mu\text{g/ml}$  streptomycyny, 0,25  $\mu\text{g/ml}$

**Estradiol 17- $\beta$  (Sigma) 2  $\mu\text{g/ml}$**

**HMG (Human Menopausal Gonadotrophin, Humegon Organon, Pergonal Serono) 0,1 j.m/ml**  
lub **FSH (Sigma) 1  $\mu\text{g/ml}$  + LH 0,2  $\mu\text{g/ml}$**

**Filtrowanie (filtr 0,22  $\mu\text{m}$ )**

**Zostawić do gazowania w 5%  $\text{CO}_2$  przez 2 – 4h przed użyciem**

# Niektóre czynniki wpływające na IVM

- # Systemy buforów, osmolarność, ciśnienie powierzchniowe
- # Jakość wody
- # Czas dojrzewania
- # Antybiotyki, parafina
- # Temperatura, atmosfera, czynniki toksyczne
- # Surowica krwi i albumina
- # Płyn pęcherzykowy
- # Hormony i czynniki wzrostu
- # Cytokiny



# Techniki pobrania oocytów w IVM



# Techniki pobrania oocytów

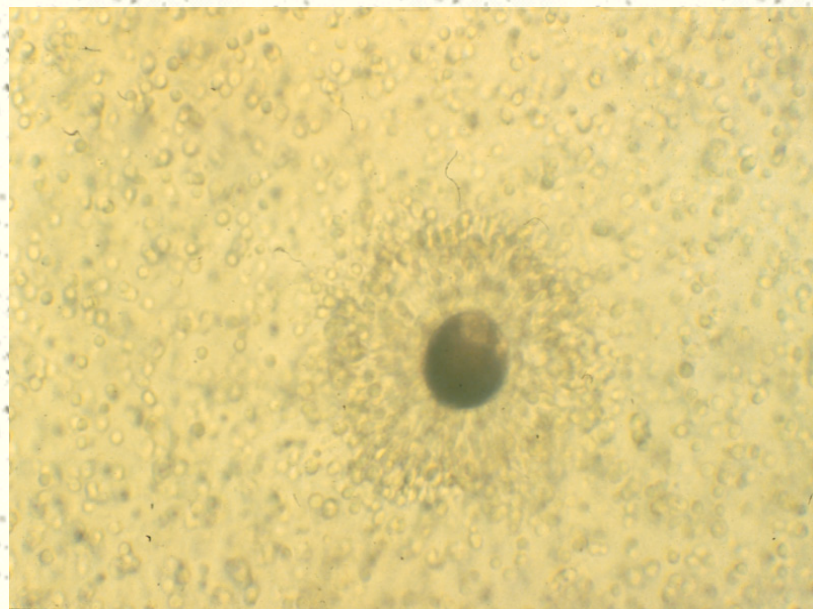
- # Aspiracja pęcherzyków
- # Spreparowanie całych pęcherzyków
- # Wycinanie powierzchni jajników
- # Wycinanie powierzchni jajników po aspiracji pęcherzyków
- # Trawienie enzymatyczne małych pęcherzyków
- # Laparoscopia przez pochwową
- # Punkcja pęcherzyków jajnikowych pod kontrolą USG (OPU)

# Pobieranie oocytów przez aspiracji pęcherzyków Jajnikowych u świń



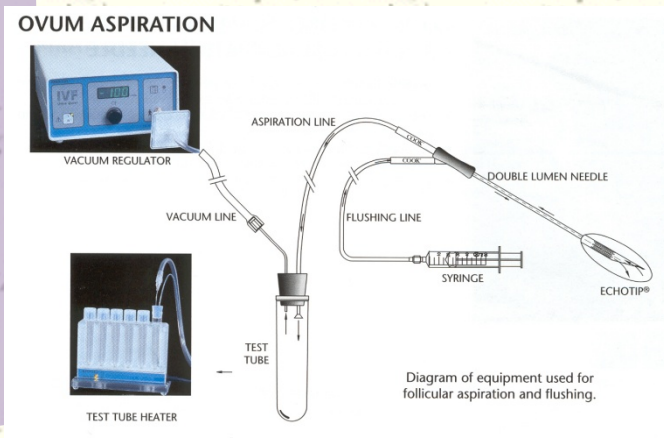
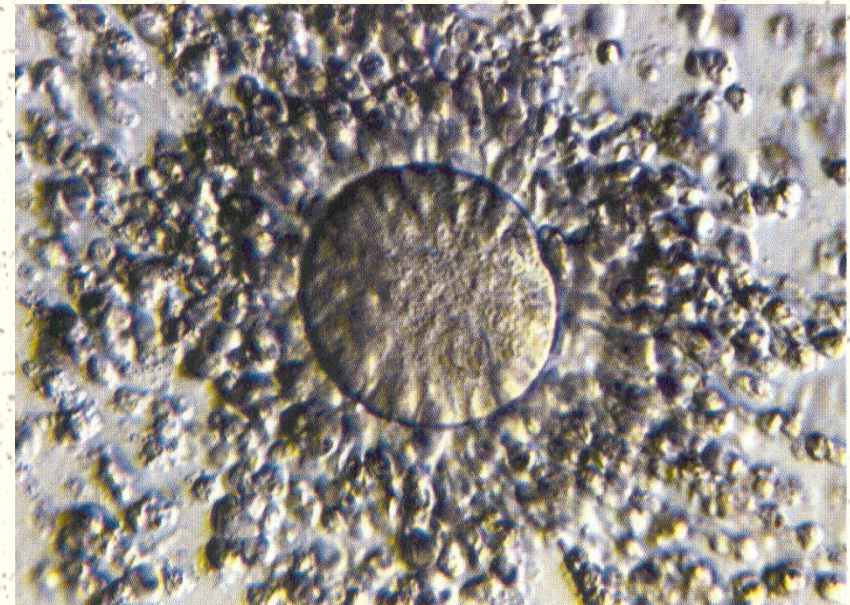


# OPU u klaczy





# Oocyte Pick-Up (OPU)



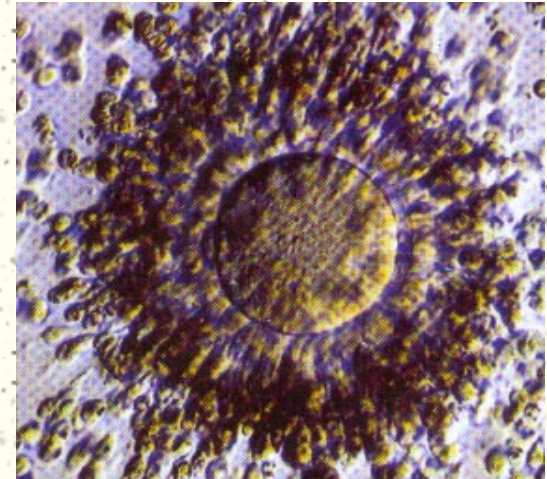
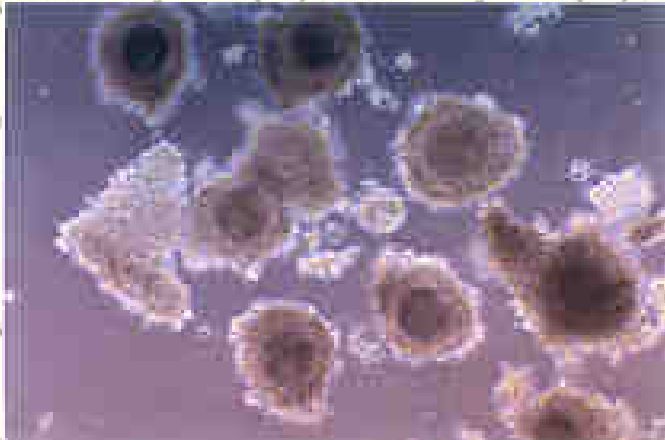
Oocyte retrievals by transvaginal aspiration under USG.

Flushing medium (Medicult) for isolation of cumulus-oocyte complex (COCs)

# Zapłodnienie *in vitro* - IVF

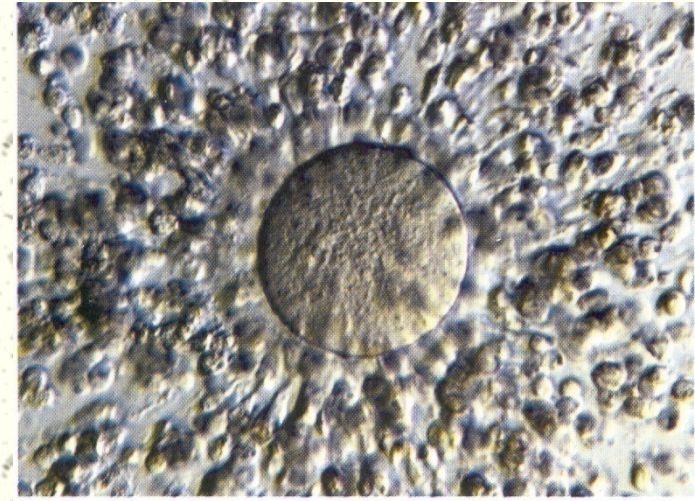
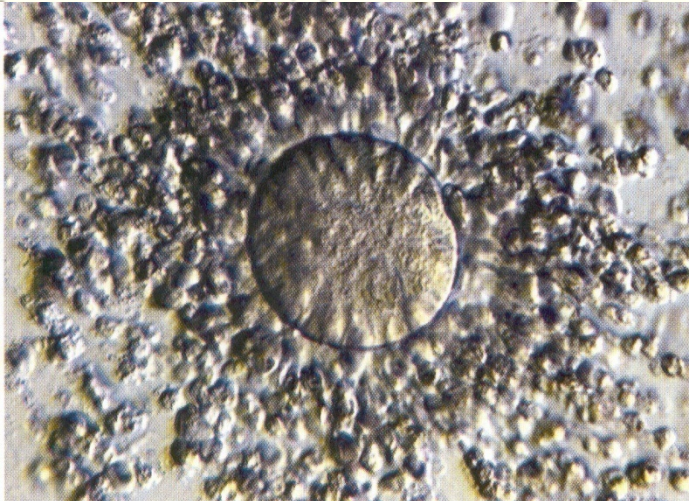
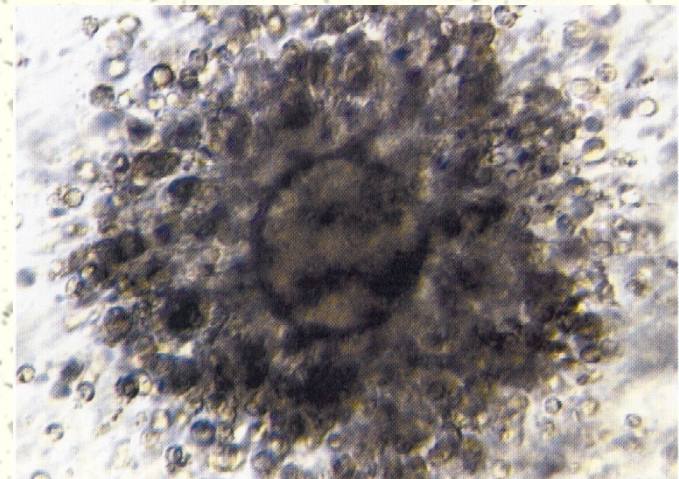
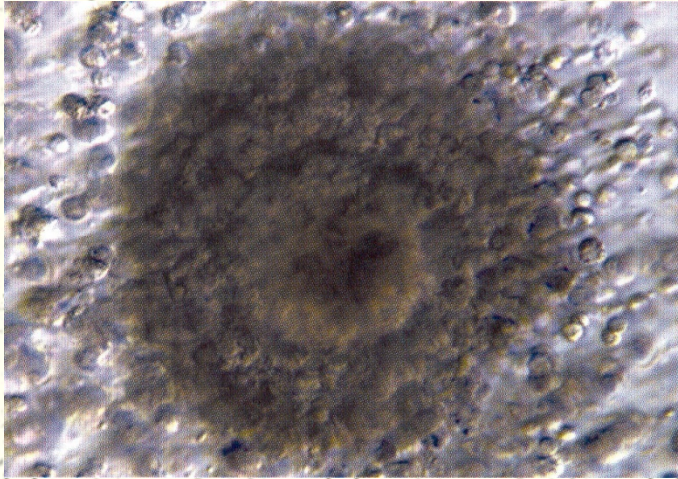


# Kompleksy oocyt-wzgórek jajonośny



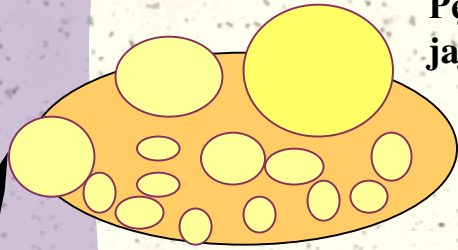


# Kompleksy oocyt-wzgórek jajonośny

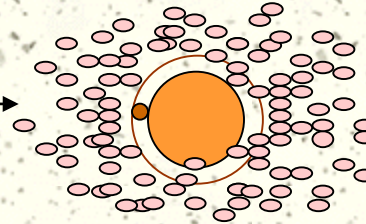




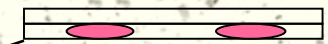
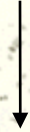
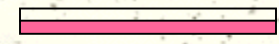
**Pęcherzyk jajnikowy**



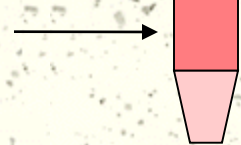
**Pobieranie kompleksów oocyt-wzgórek jajonośny**



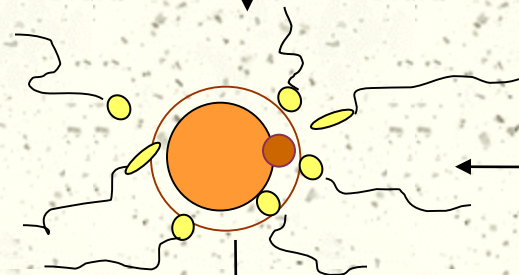
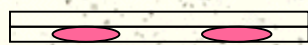
**Izolacja kompleksów  
Klasyfikacja  
Płukanie**



**Przygotowanie i selekcja plemników na gradiencie**



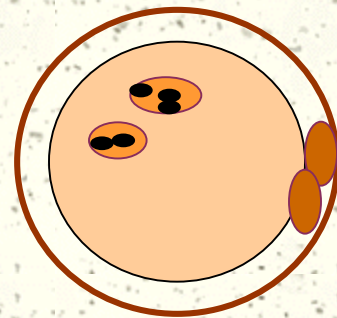
**Inseminacja  
20 tys. plemników/oocyt**



**IVF  
Kapacytacja plemników  
i zapłodnienie (18 - 20 h,  
37,2 °C, 5% CO<sub>2</sub>)**



**IVC  
Zapłodnione oocyty hodujemy dalej  
(37,4 °C, 5% CO<sub>2</sub>)**



**Ocena zapłodnienia**

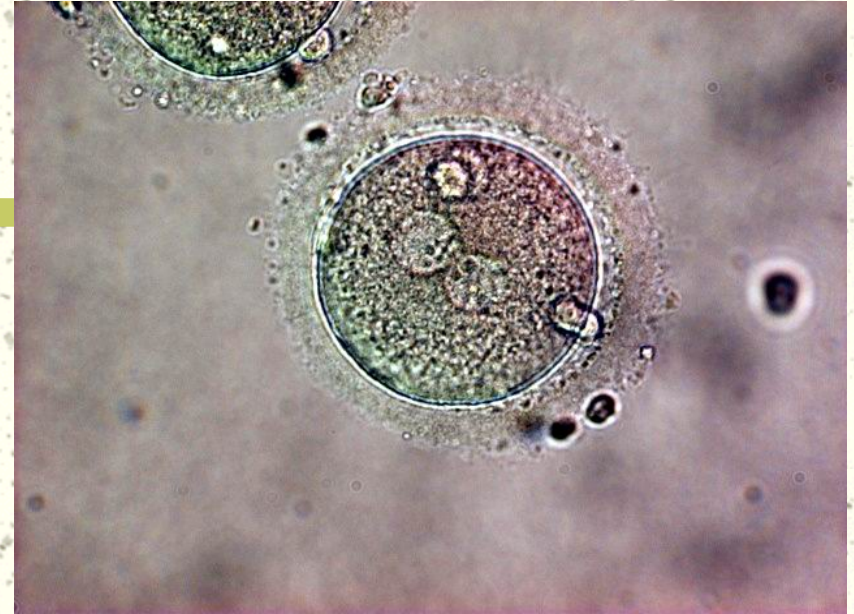


IVF





# IVF





# Polispermia

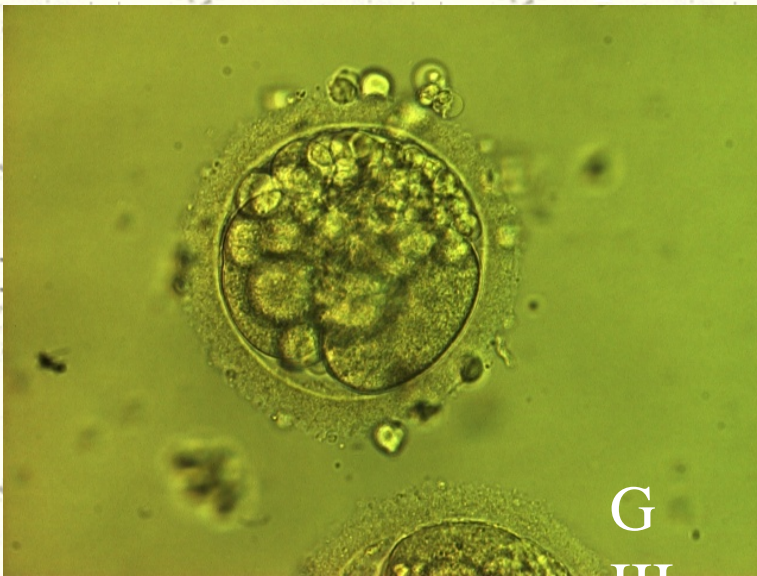
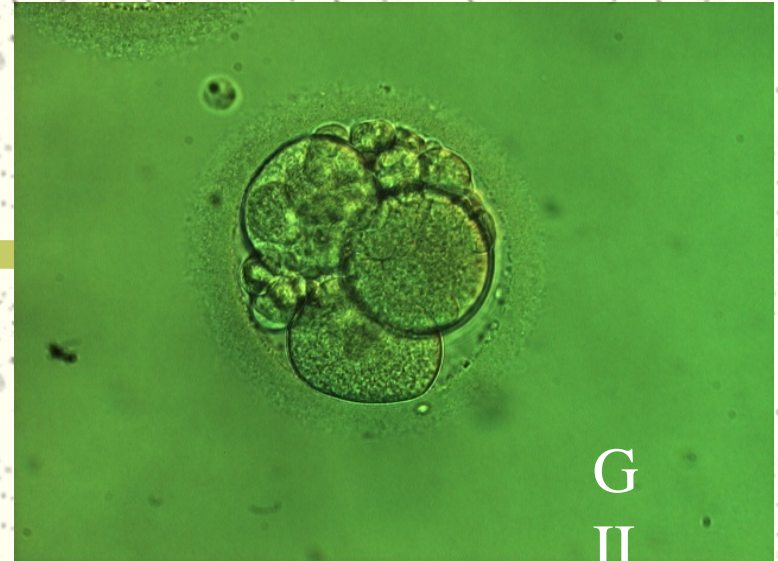
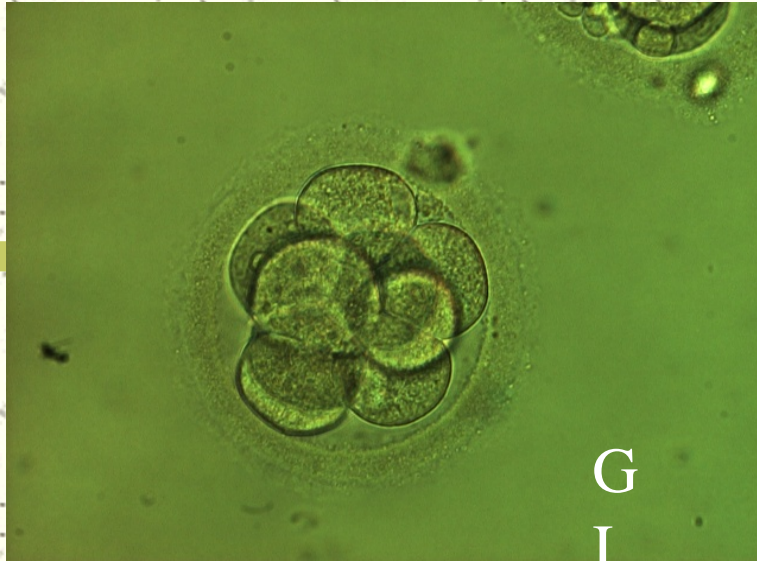




# Hodowla zarodków in vitro IVC



# Jakość zarodków po IVF



# Techniki IVC

---

- # Hodowla stała w mediach chemicznie definiowanych
  - Hodowla prosta
  - Hodowla sekwencyjna
  - Hodowla jedno stopniowa
- # Współhodowla z komórkami somatycznymi



# Rozwój zarodkowy - IVC





**Table 4.8.** SOF formulation employed as a single culture system for bovine embryo production (from Gandhi *et al.*, 2000).

Reagent (mmol l <sup>-1</sup> )	SOFM (maturation)	SOFF (fertilization)	SOFS (sperm wash)	SOFC1 (culture 1)	SOFC2 (culture 2)
Sodium pyruvate	0.33	0.33	1.0	0.33	0.33
Glutamine	1.0	–	–	1.0	1.0
Glucose	1.5	–	–	1.5	3.0
Sodium lactate	–	–	18.3	–	–
HEPES	–	–	12.5	–	–
Bovine serum albumin	–	6 mg/ml fatty acid free	3 mg/ml fraction V	8 mg/ml crystallized	8 mg/ml crystallized
EDTA	–	–	–	0.1	–
Taurine	–	–	–	0.1	–
MEM. NEAA	1x	2x	–	1x	1x
MEM. EAA	1x	–	–	1x	1x
MEM. vitamins	–	–	–	–	1x

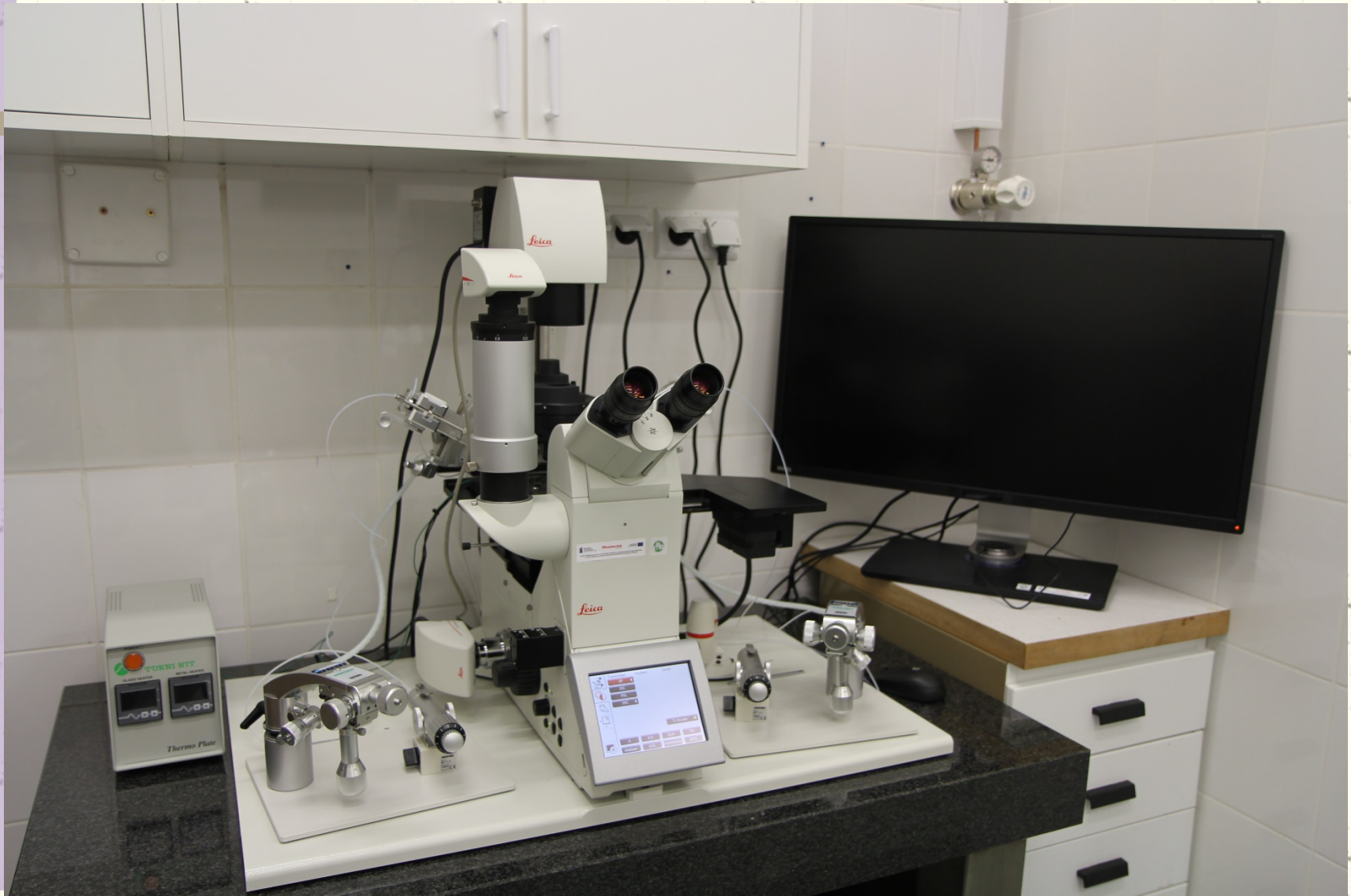
MEM, Eagle's minimum essential medium; NEAA, non-essential amino acids; EAA, essential amino acids. Supplements added to base SOF medium for specific developmental stages.

# Docytoplazmatyczna iniekcja plemników ICSI

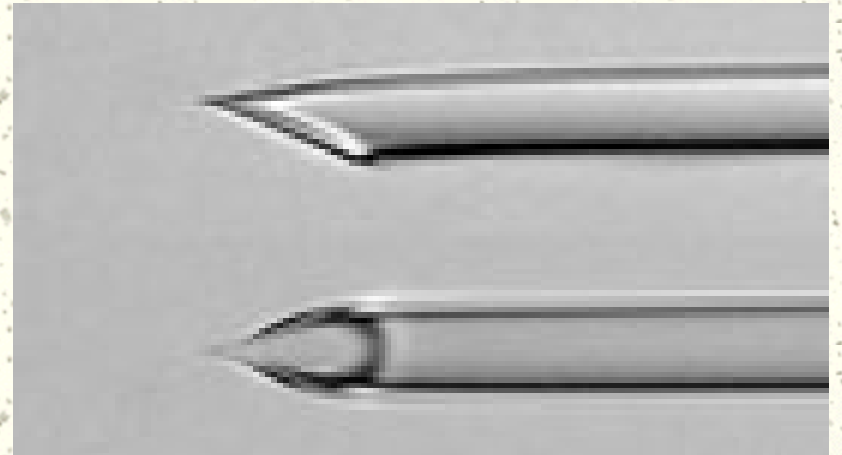
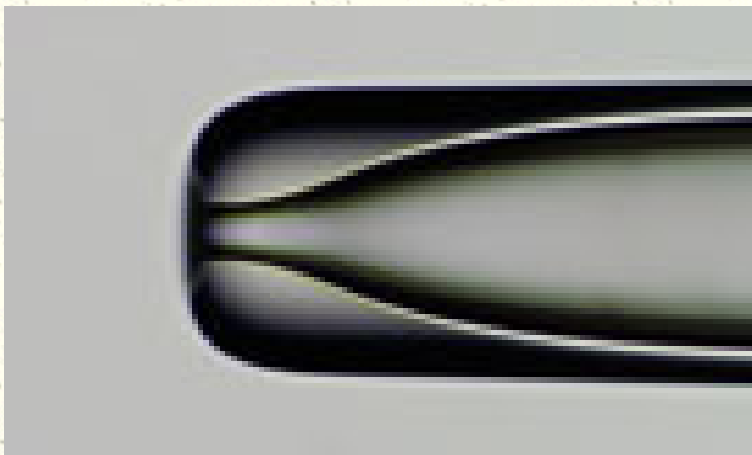
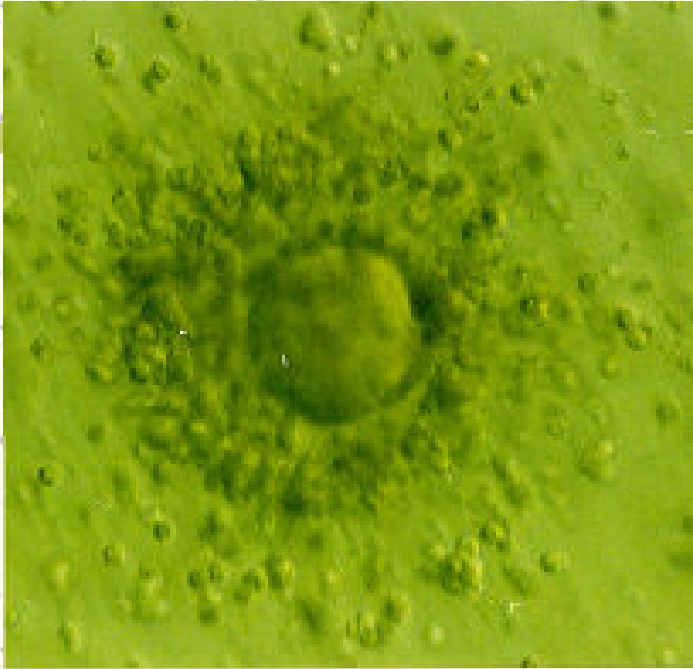




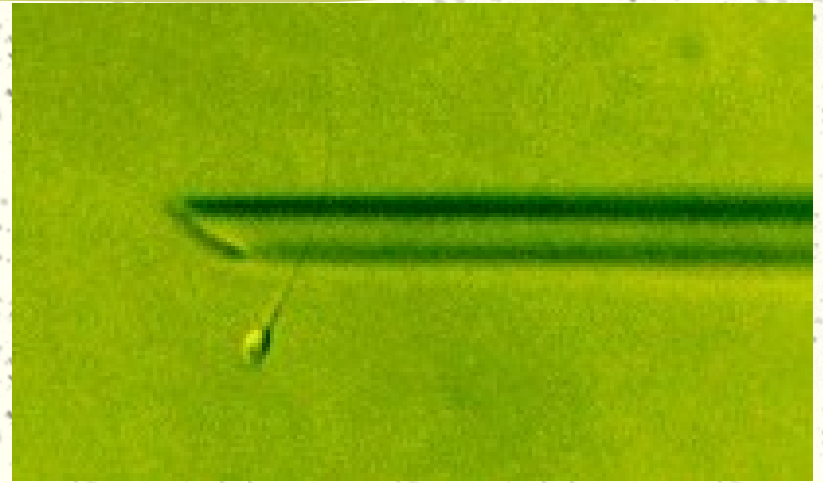
# Stanowisko do ICSI i IMSI



# ICSI

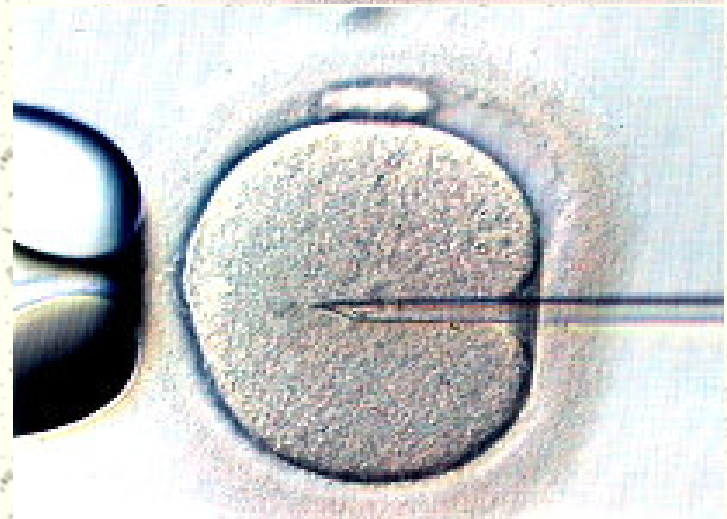
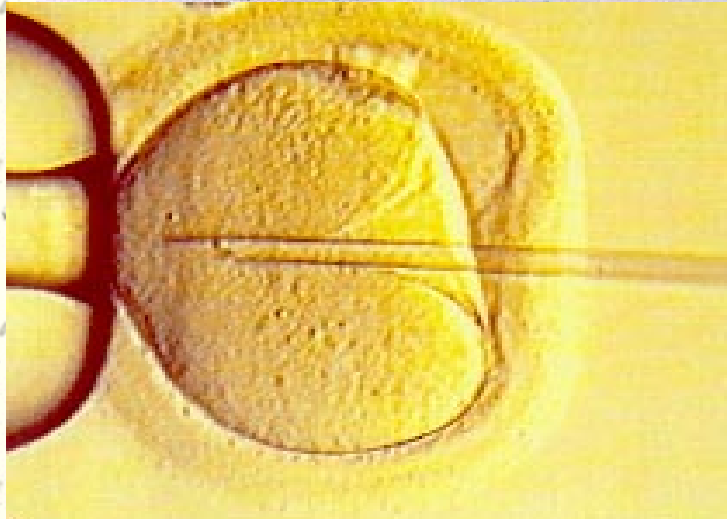
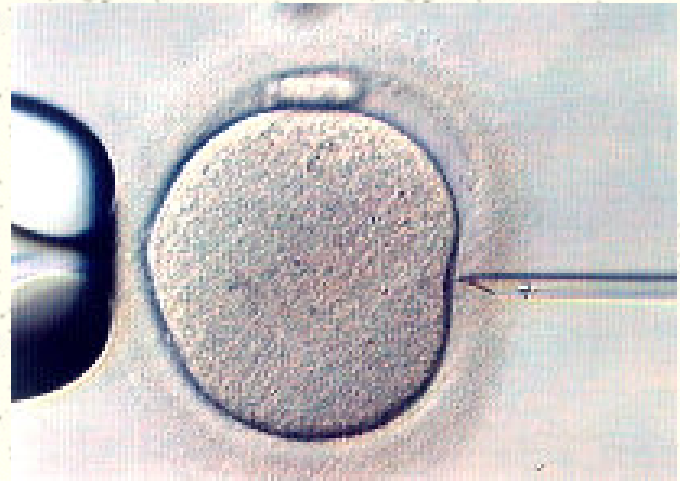


# ICSI - Immobilizacja plemników

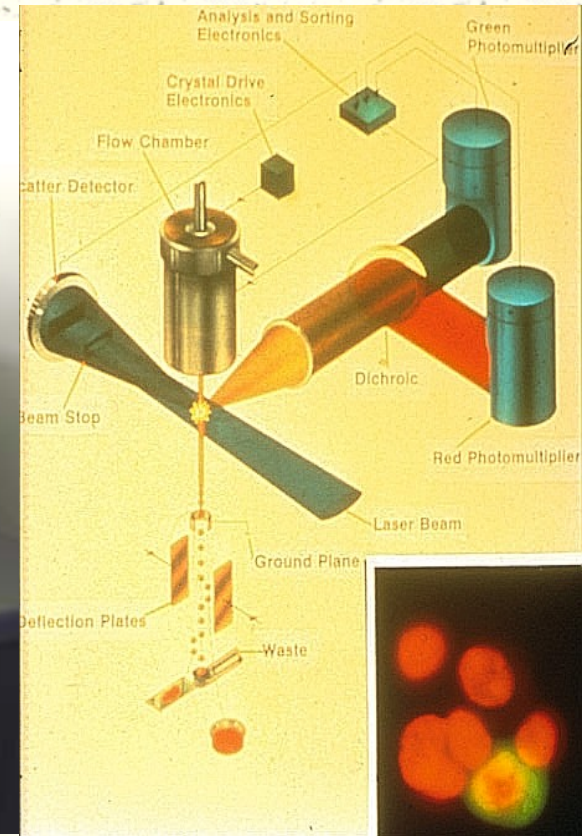




# ICSI



# Seksowanie plemników

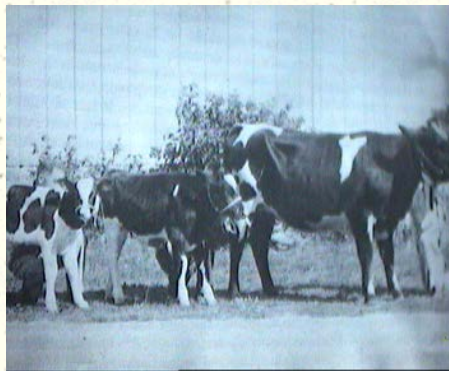
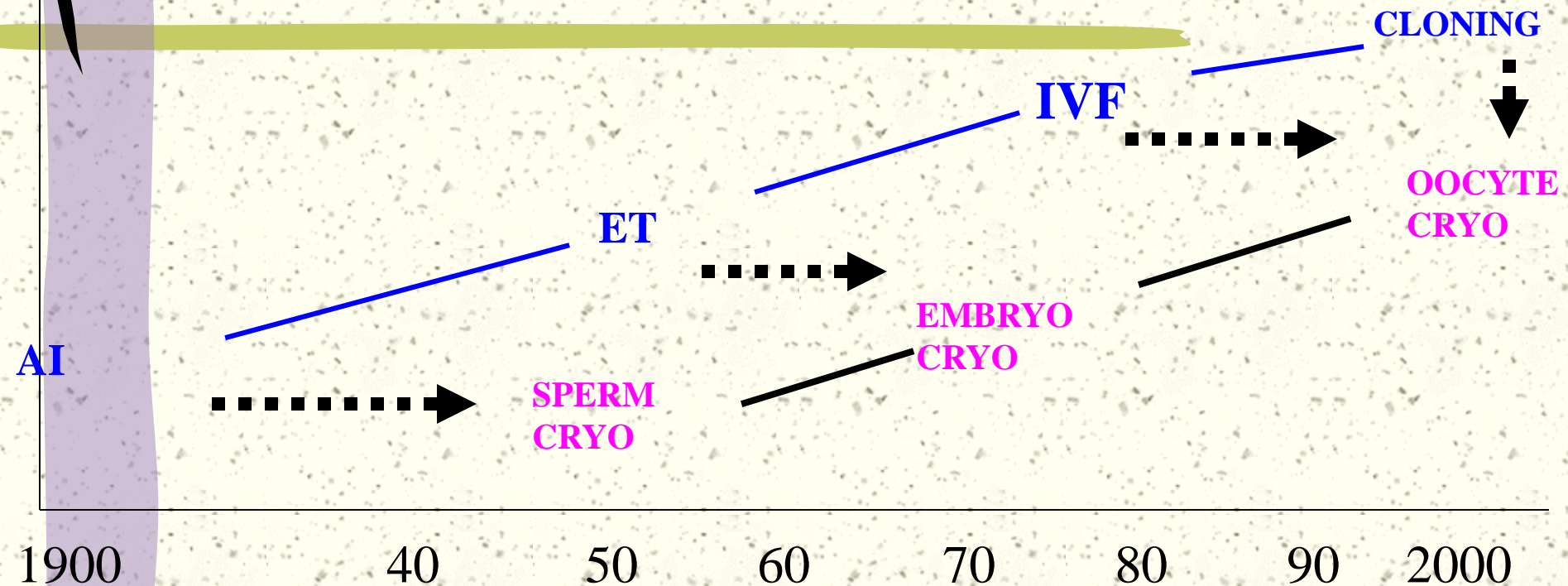


# Konserwacja plemników i zarodków w niskich temperaturach





# HISTORY OF ANIMAL'S REPRODUCTION BIOTECHNOLOGY AND ITS EFFECT ON CRYOBIOLOGY DEVELOPMENT



# KRIOKONSERWACJA

**Zamrażanie**

**(rozmrążanie)**

Niskie stężenie środków  
osłaniających, 1-3 mole,  
pełne wysycenie

Powolne tempo schładzania  
 $0,3-1,0^{\circ} \text{C}/\text{min}$

Odwodnienie komórek głównie  
w trakcie zamrażania

**Witryfikacja**

**(ogrzewanie)**

Wysokie stężenie środków  
osłaniających, 4-8 moli,  
częściowe wysycenie

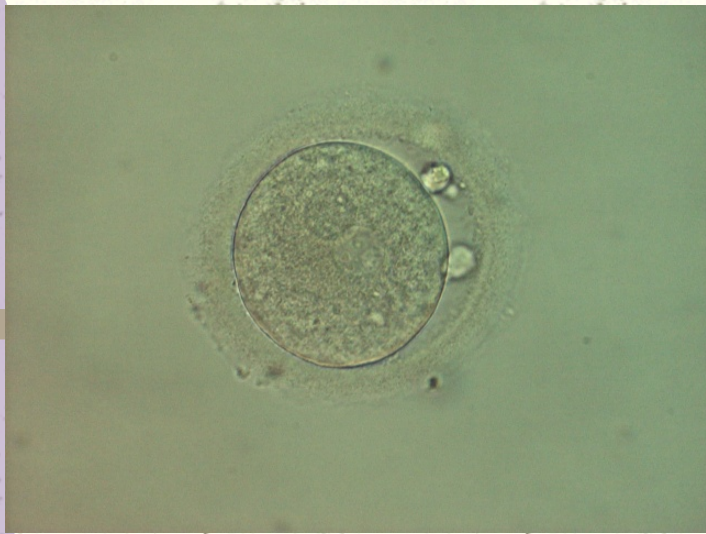
Wysokie tempo schładzania  
 $>2000^{\circ} \text{C}/\text{min}$

Odwodnienie komórek  
poprzedza schładzanie

# CZYNNIKI WPŁYWAJĄCE NA EFEKTY KRIOKONSERWACJI ZARODKÓW SSAKÓW

- # gatunek, z którego pochodzi zarodek
- # - genetyczna i biologiczna jakość zarodka (efekt szczepu)
- # - stadium rozwojowe zarodka
- # - metoda pozyskania zarodka (*in vivo* lub *in vitro*)
- # - właściwa, odpowiednio dobrana metoda kriokonserwacji

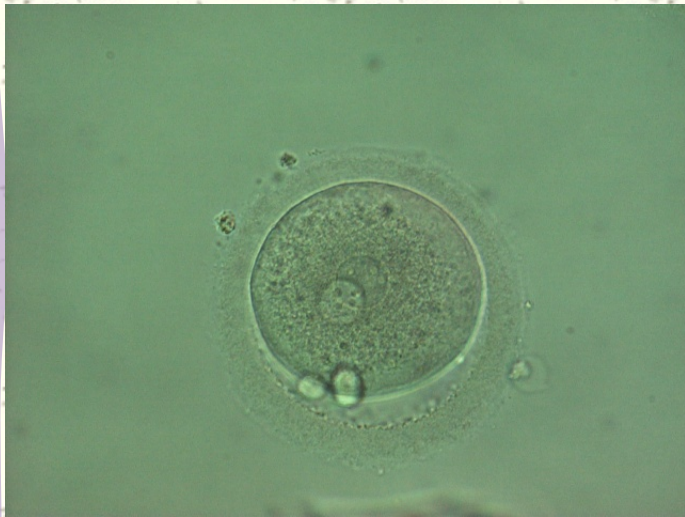




2 PN



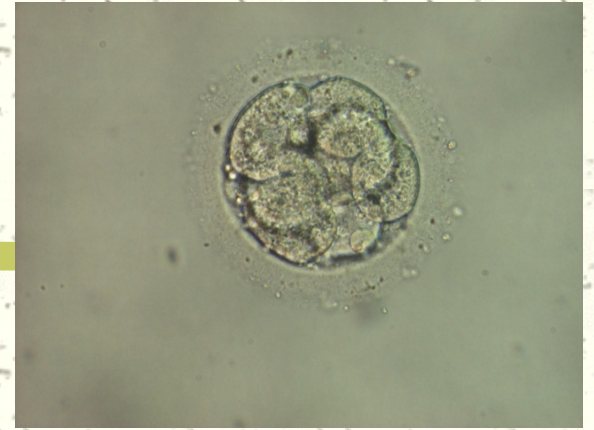
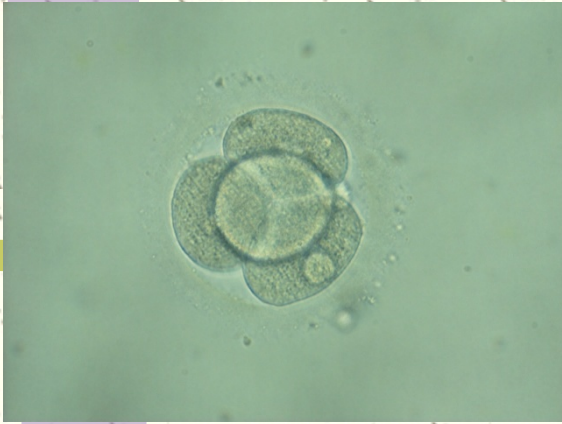
6 bl



2 PN



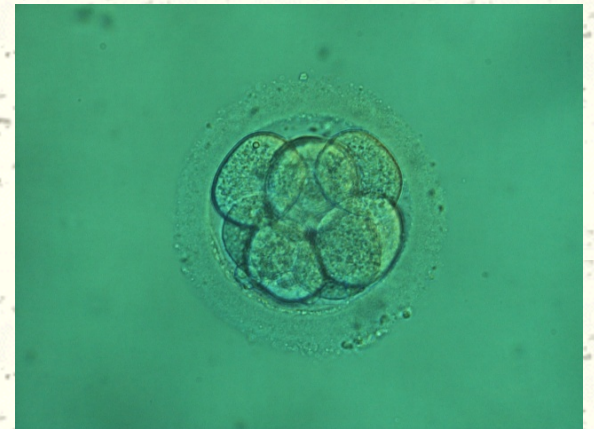
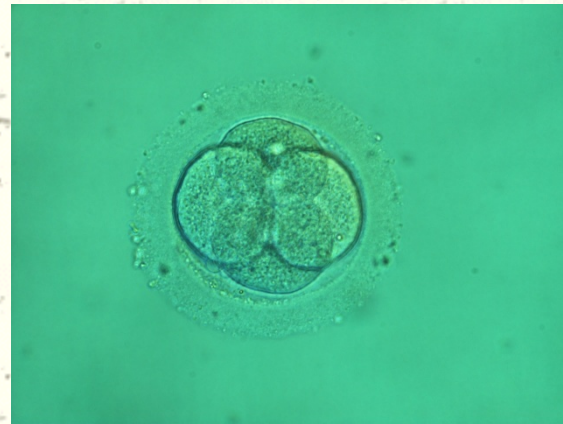
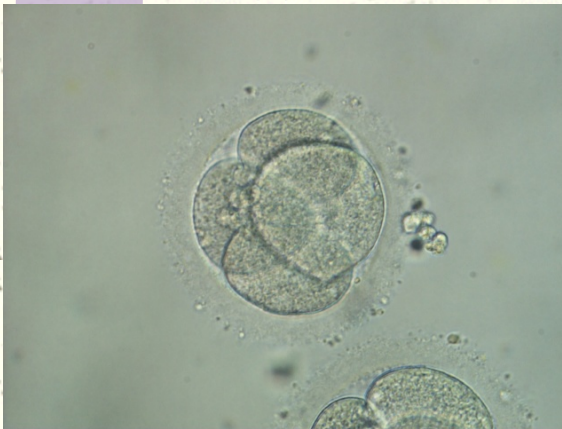
5 bl



4 bl przed zamrożeniem

4 bl po zamrożeniu

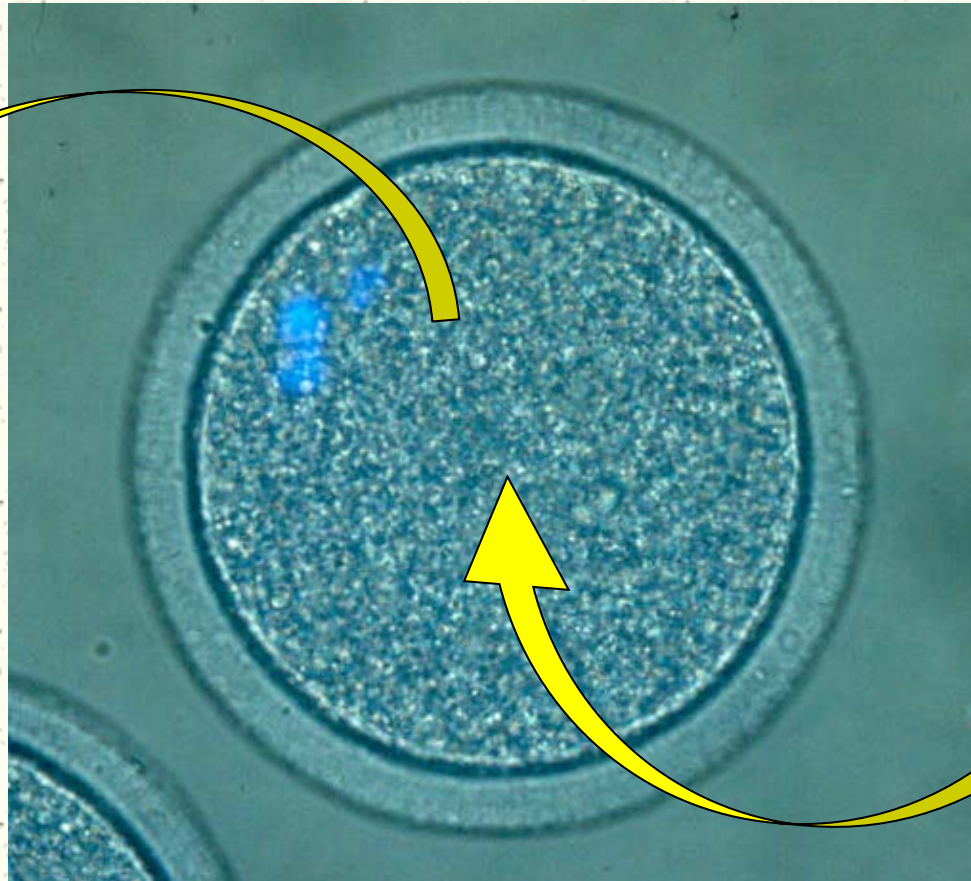
8 bl , po 24h hodowli





# Główne trudności w kriokonserwacji oocytów

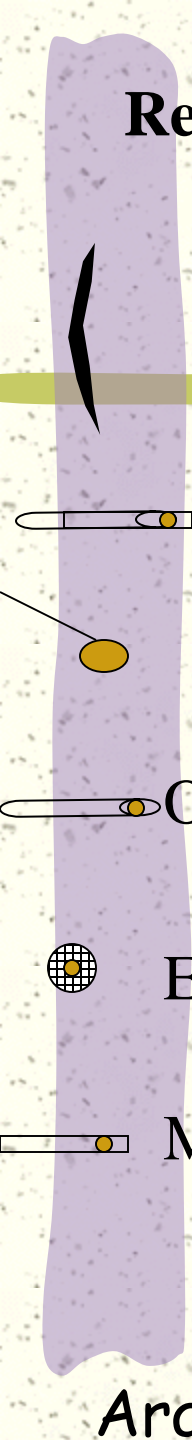
**Wewnętrzne:**  
struktura i funkcja  
oocytu

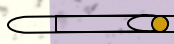

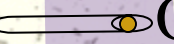

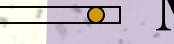


**Zewnętrzne**  
Krioprotektanty,  
Niskie temperatury



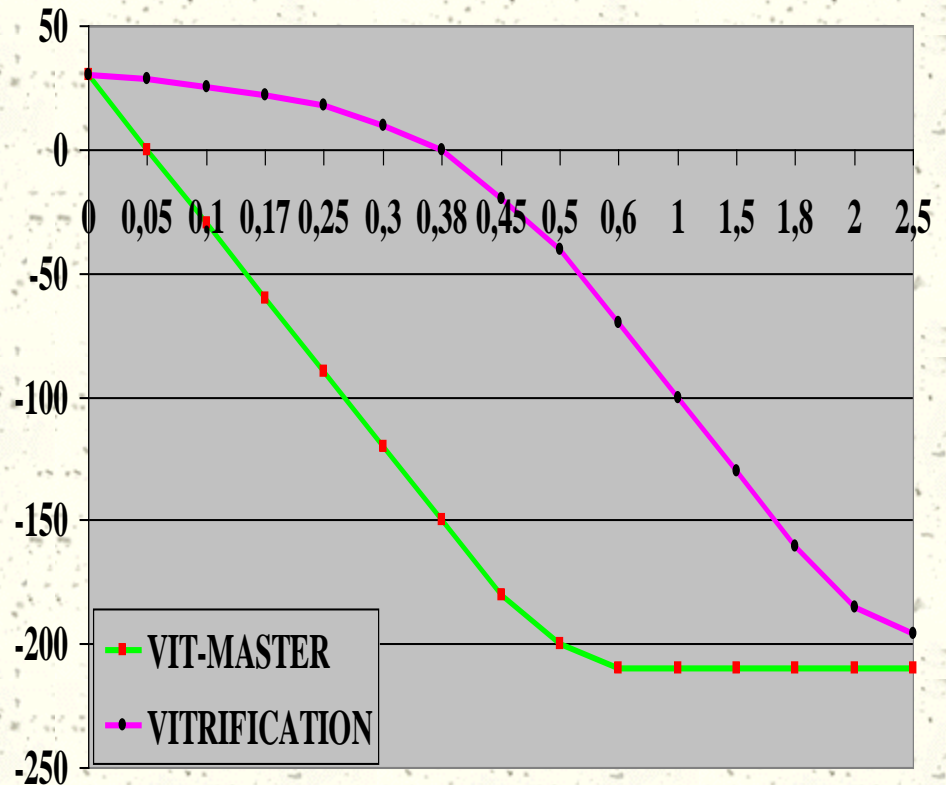
# Recent vitrification methods of oocytes using minimal volume



	Cooling rate/volume	References
 Cryotop	<b>0.1-0.5<math>\mu</math>l</b>	Kuwayama 2005
 CRYOLOOP	<b>?</b>	Lane et al., 1999
 OPS/SOPS	<b>0.5-2<math>\mu</math>l</b>	Vajta 1998
 EM GRIDS	<b>0.5-1<math>\mu</math>l</b>	Martino and Liebo 1996
 MDS	<b>0.07-0.5<math>\mu</math>l</b>	Arav 1992

# DEVELOPMENT OF LINEAR AND RAPID COOLING RATE USING THE VIT-MASTER VITRIFICATION APPARATUS

Vit-Master



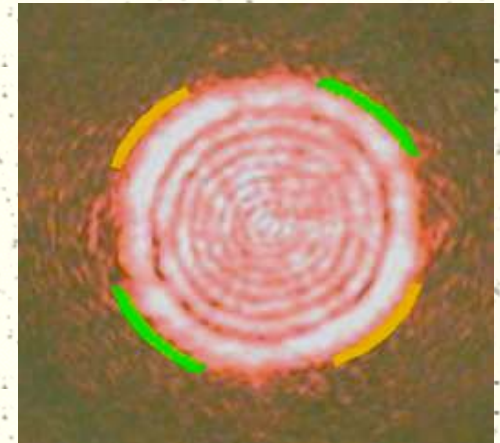
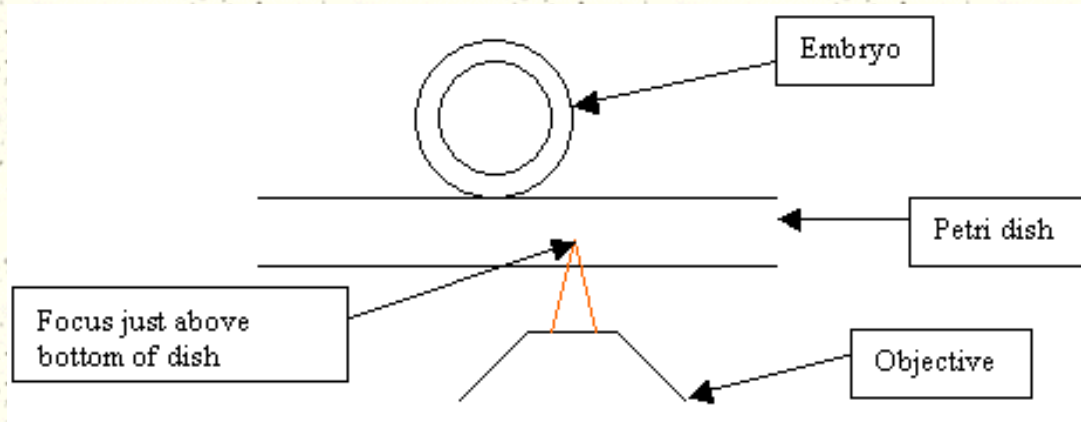
Arav 2007

# Laserowe wspomaganie wykluwania się zarodka LAZH



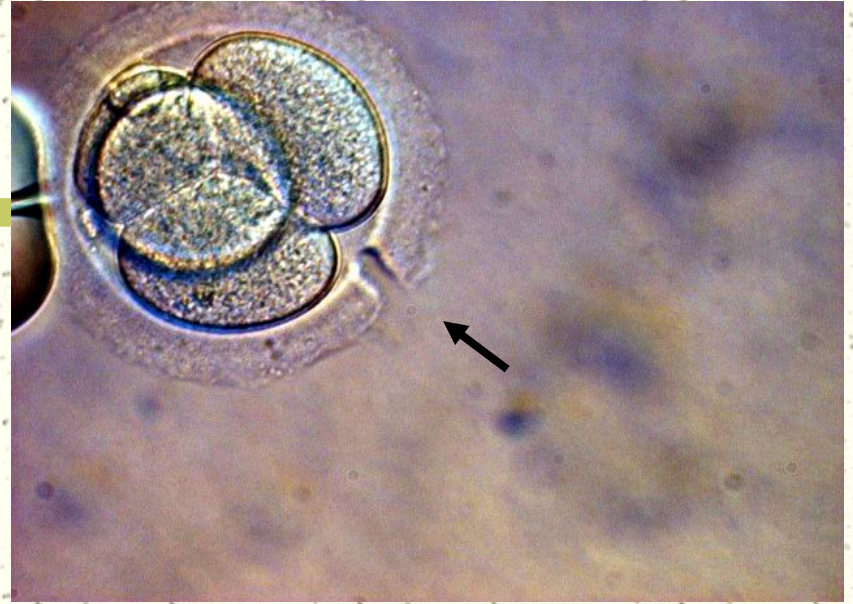


# LAZH





# LAZH



# Klonowanie





# Klonowanie

- # Wszelkie procedury umożliwiające uzyskanie osobników identycznych genetycznie, czyli **klonu**.
  - ❖ **Klonowanie zarodkowe**: procedurom klonowania podlegają zarodki lub niezróżnicowane komórki pochodzenia zarodkowego (pierwotne komórki zarodkowe).
  - ❖ **Klonowanie somatyczne**: zróżnicowane komórki somatyczne pochodzące zarówno z tkanek płodowych, jak i tkanek dorosłych zwierząt



Ian Wilmut



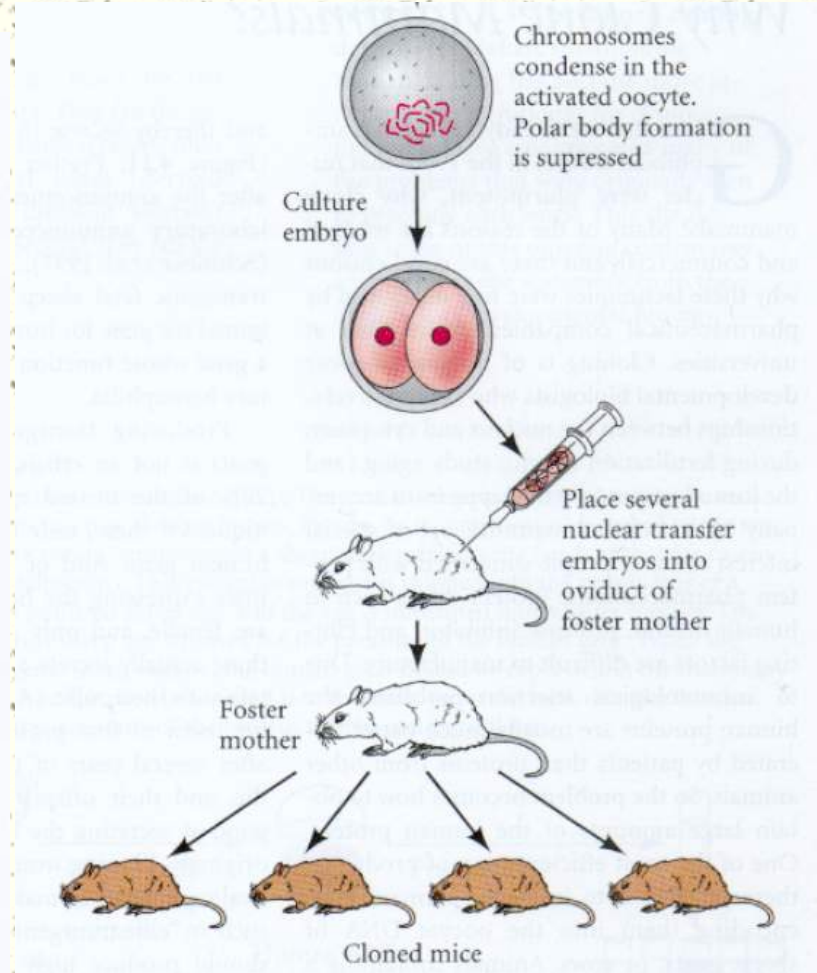
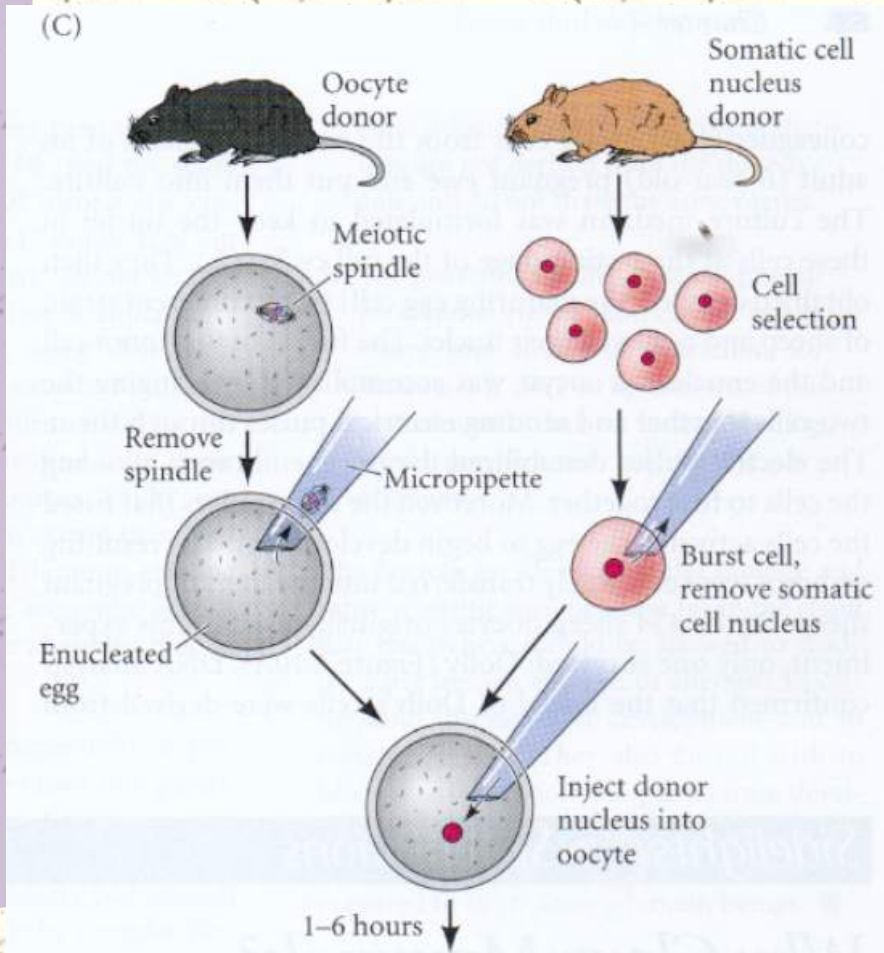
Dolly i Bonnie

# Metody uzyskania klonów

- # Prawdziwe (idealne klony) – klon zarodkowy
  - ❖ Izolacja blastomerów zarodków 2-,4- i 8-komórkowych
  - ❖ Izolacja i reagregacja blastomerów (klonowanie chimerowe)
  - ❖ Dzielenie (bisekcja) zarodków w stadium moruli lub blastocysty
- # Klony genetyczne
  - ❖ Transplantacja jąder komórek zarodkowych do enukleowanych oocytów i blastomerów



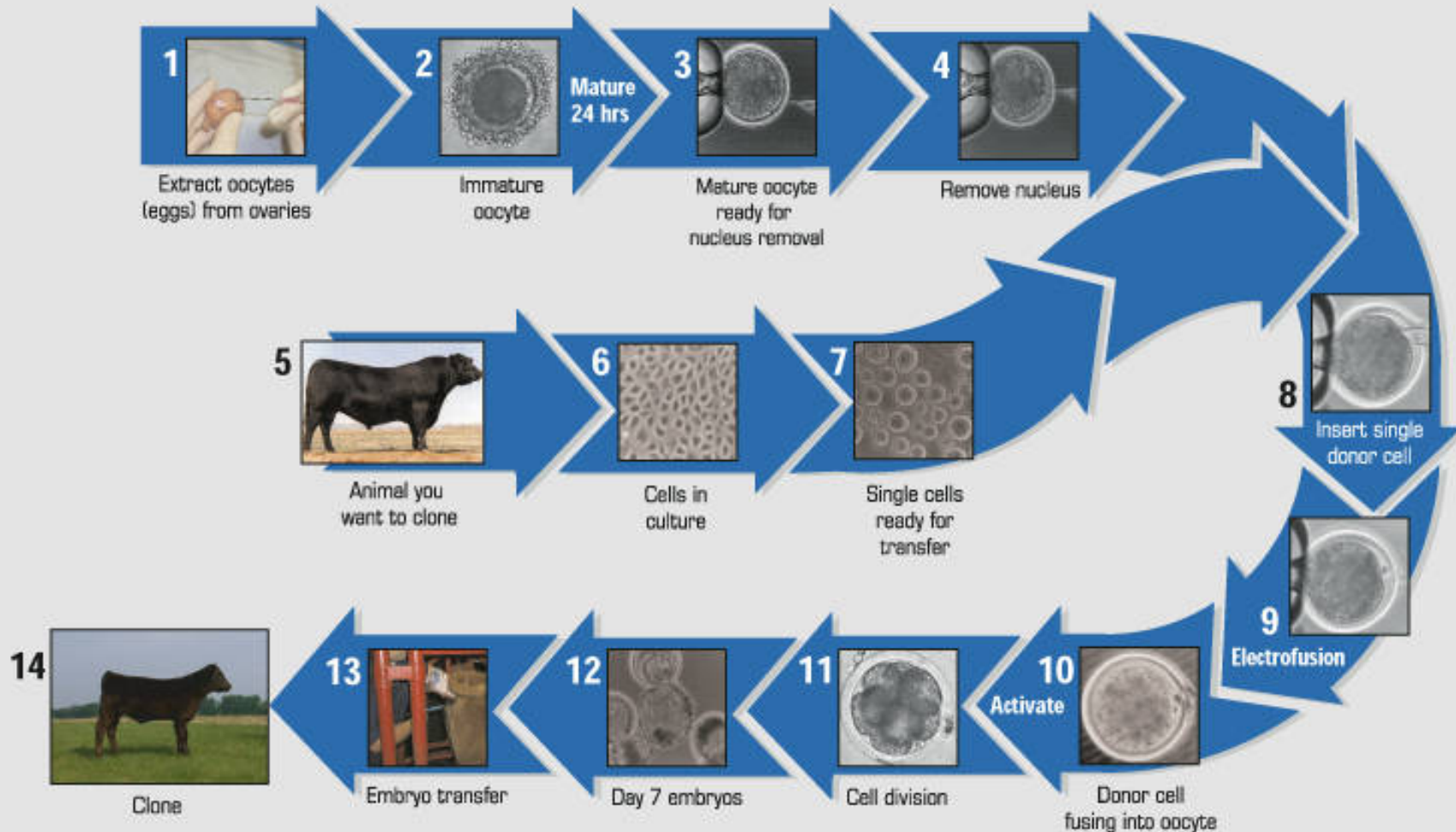
# Klonowanie u myszy



# Klonowanie u myszy



# Klonowanie u bydła





# Zarodkowe komórki macierzyste

---

- # Zarodkowe komórki macierzyste posiadają zdolność do nieograniczonej liczby podziałów in vitro i różnicowania się w wiele typów komórek.

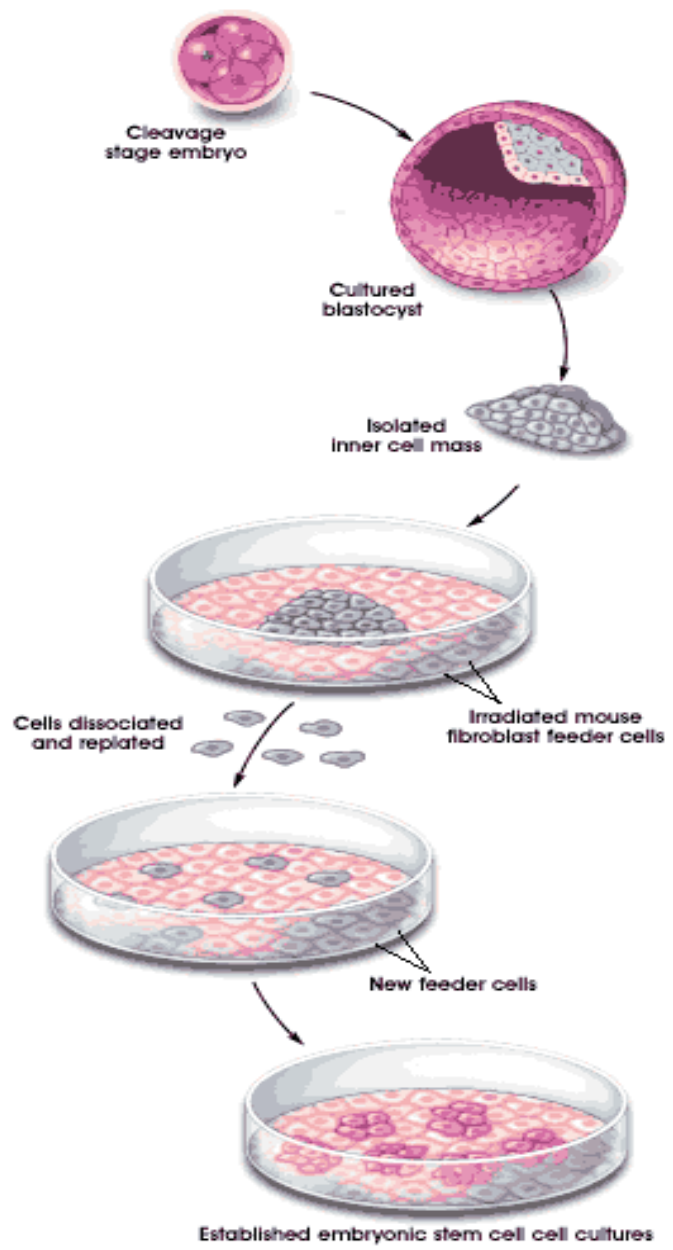


Figure C.1. Techniques for Generating Embryonic Stem Cell Cultures.

# Możliwości wykorzystania zarodkowych komórek macierzystych

---

- # Poznanie czynników stymulujących różnicowanie komórek.
- # Nowe sposoby wytwarzania i testowania leków.
- # Produkcja zwierząt transgenicznych.
- # Terapia komórkowa.



# Metody uzyskiwania zwierząt transgenicznych

- # Transfekcja plemników i użycie ich do zapłodnienia *in vitro*
- # Transfekcja plemników i wprowadzenie jednego z nich do cytoplazmy oocytu
- # Transfekcja komórek i użycie ich do klonowania
- # Mikroiniekcja egzogenego DNA do zygoty
- # Wprowadzenie egzogenego DNA za pomocą lentowirusów



**Dziękuję za  
uwagę**