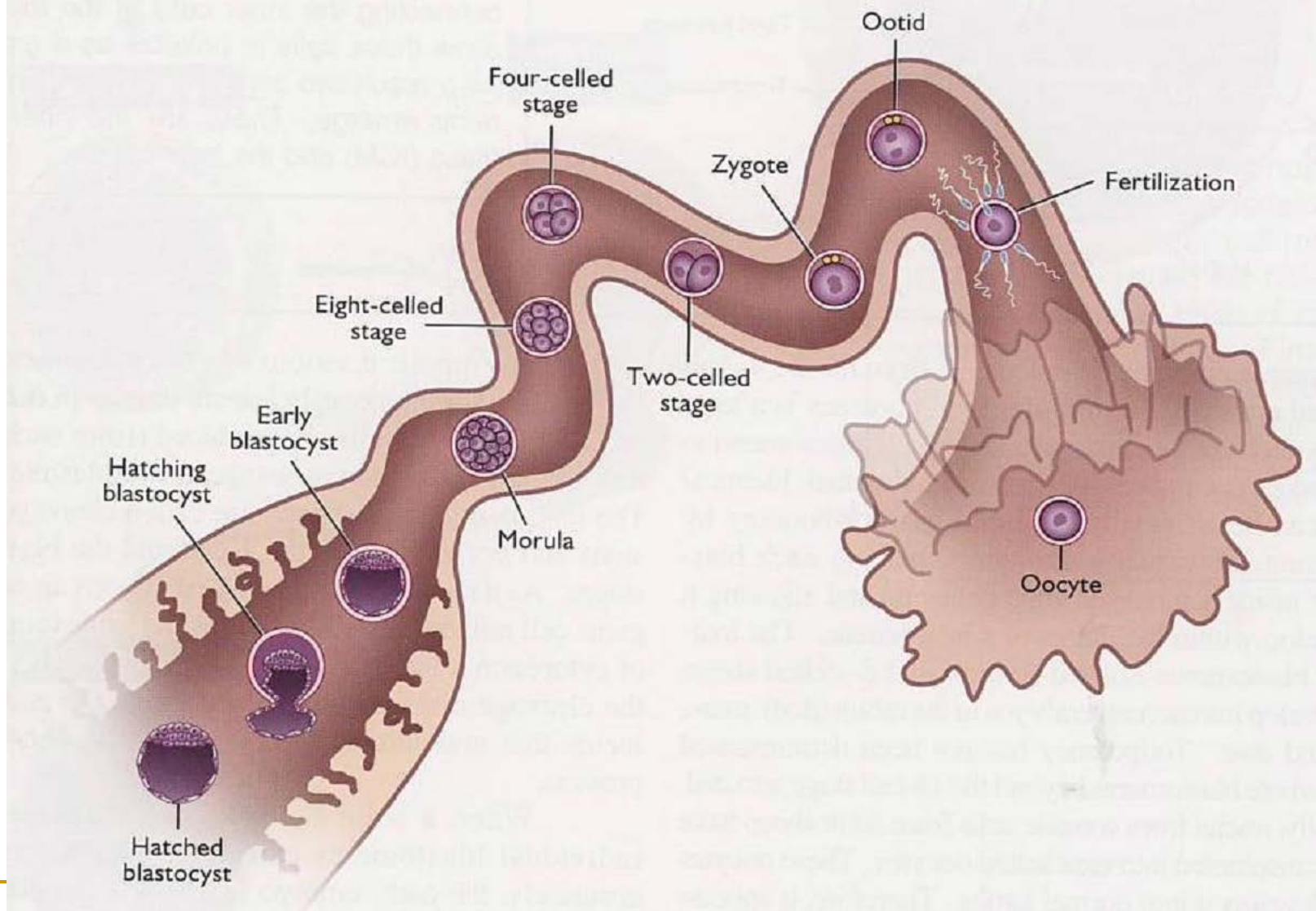


---

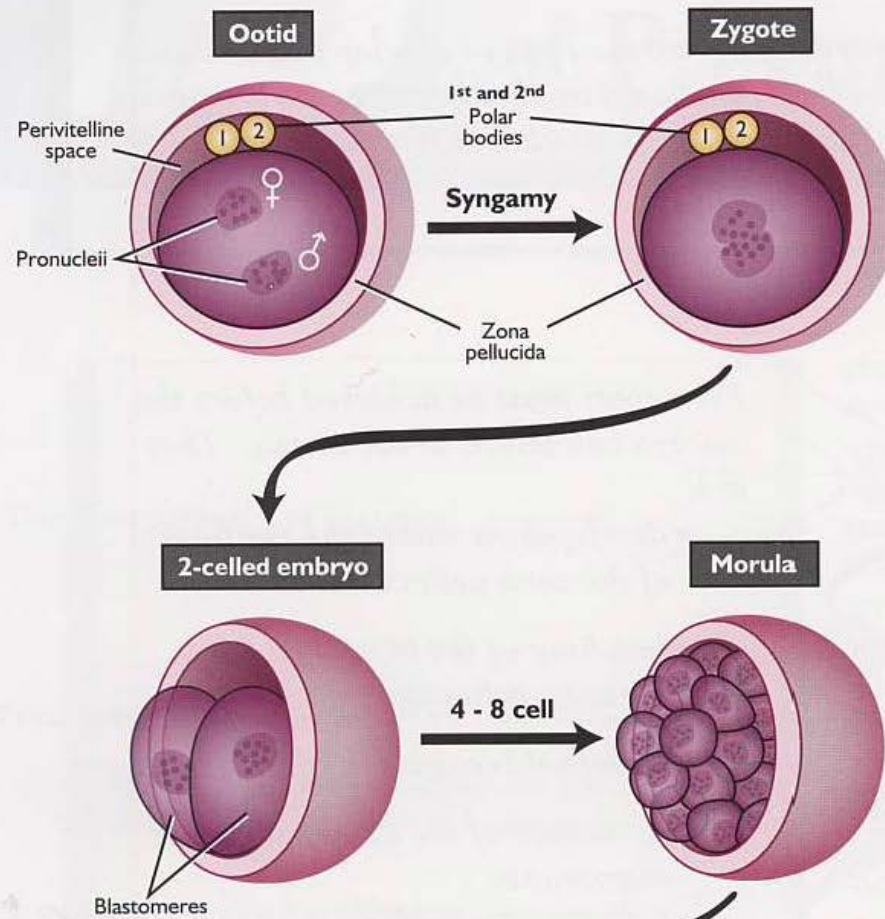
# Przedimplantacyjny rozwój zarodków *in vivo*

---

**Figure 13-3.** Schematic Illustration of Preattachment Embryo Development



**Figure 13-1.** Preattachment Development of the Embryo



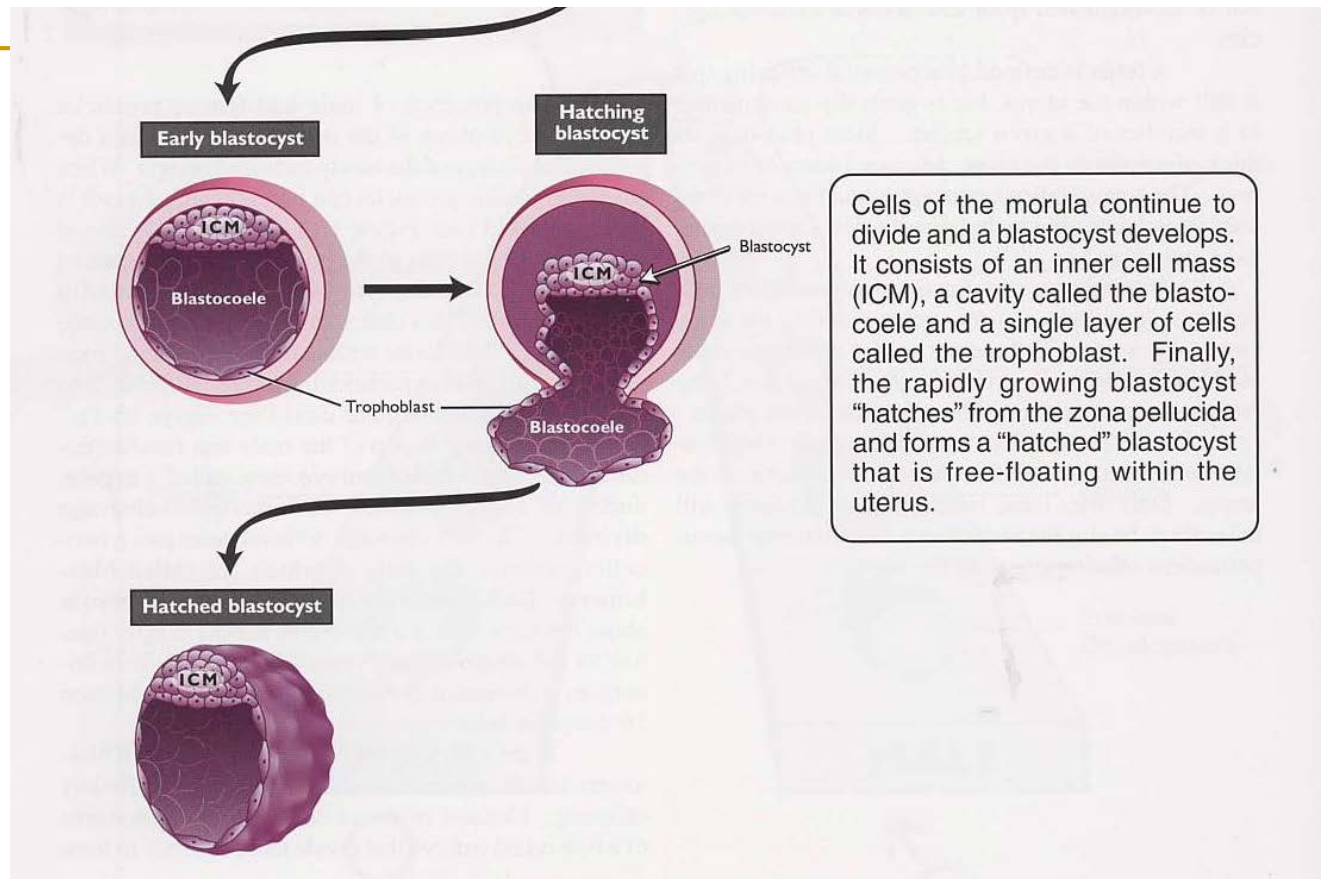
In the ootid, male and female pronuclei along with the first and second polar bodies are present. Fusion of the male and female pronuclei into a single diploid nucleus constitutes syngamy. Shortly thereafter, the zygote undergoes cleavage (mitotic divisions) and gives rise to daughter cells called blastomeres.

Cleavage divisions continue. A four-celled embryo gives rise to an eight-celled embryo. After the eight-celled stage, a ball of cells is formed and this embryonic stage is referred to as a morula.

---

# Rozwój przedimplantacyjny

- Aktywacja genomu zarodkowego rozpoczyna się w stadium dwukomórkowym u myszy i innych gryzoni, między stadium 8-16-komórkowym u krowy i owcy oraz 4-8-komórkowym u naczelnych
  - W tym stadium blastocysty rozwijający się zarodek opuszcza swoją osłonkę przejrzystą, osiągając możliwość implantacji.
  - W tej formie zarodek składa się z trzech warstw komórek: zewnętrznej spolaryzowanej, nabłonkowej trofoektodermy, prymitywnej endodermy i wielopotencjalny ICM.
  - Formowanie trofoektodermy i następnie jej przekształcenie w tkankę trofoblastu to najważniejsze kroki do zapoczątkowania implantacji
-



*Hatching of the blastocyst is governed by three forces. They are:*

- *growth and fluid accumulation within the blastocyst*
- *production of enzymes by the trophoblastic cells*
- *contraction of the blastocyst*

# Rozwój przedimplantacyjny

- Zwierzęta domowe charakteryzują się rozciągniętym w czasie okresem przedimplantacyjnym.
- W okresie tym odbywa się wędrówka zarodka lub zarodków
- W okresie przedimplantacyjnym dochodzi do swoistego dialogu między zarodkiem a macicą na skutek wytwarzania przez trofoblast i gruczoły maciczne wielu związków biologicznych i obecności ich receptorów w płodzie oraz u matki
- Cechą charakterystyczną implantacji u zwierząt domowych jest ich bezinwazyjność (łożysko nabłonkowo-kosmówkowe u świni i łączno-kosmówkowe u przeżuwaczy).
- U innych gatunków, np. mięsożernych, gryzoni i naczelnych, blastocysta stopniowo implantuje się do zrębu endometrium, niszcząc jego nabłonek lub łącząc się z nim (łożysko krwio-kosmówkowe, śródbłonkowo-kosmówkowe).
- Implantacja jest kompleksowym procesem, w którym biorą udział endokryjne, parakryjne, autokryjne i okołokryjne modulatory, tworząc interakcje komórka-komórka i komórka-macierz komórkowa w przestrzeni i czasie.

---

# Rozwój przedimplantacyjny

- Komórki trofoblastu produkują wiele różnorodnych czynników wzrostu, cytokin i hormonów wpływających na fizjologię zarodka i matki w auto-, para- i okołokryny sposób
-

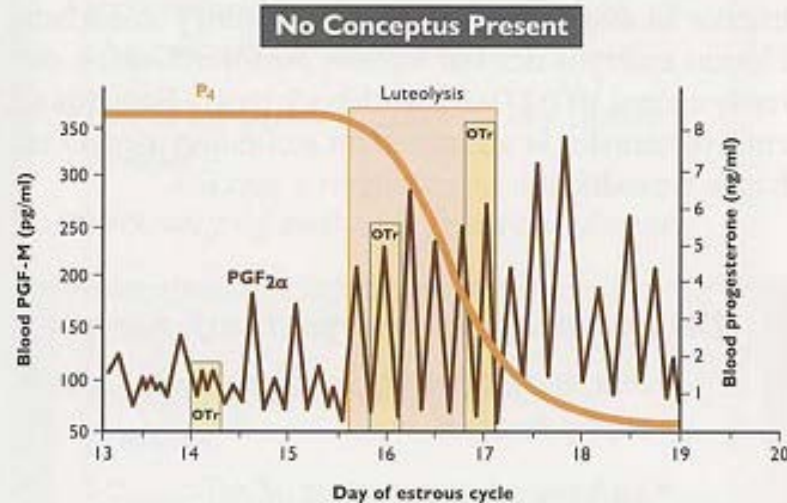
---

# Rozwój przedimplantacyjny

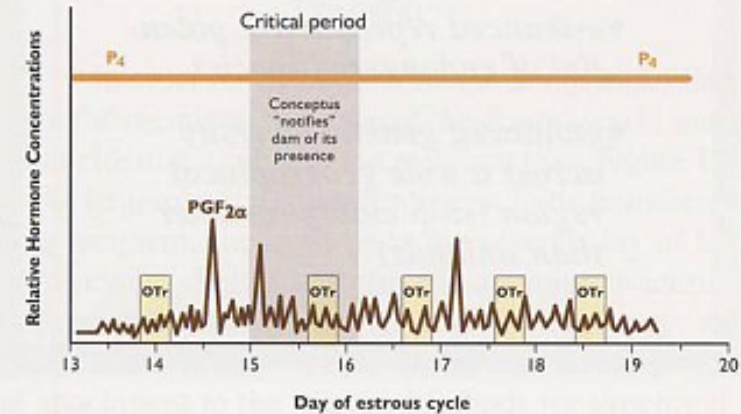
- Zarodek produkuje i wysyła sygnał lub sygnały, które bezpośrednio lub pośrednio zapobiegają strukturalnej i funkcjonalnej regresji ciała żółtego (CL).
  - Proces ten przebiega równolegle ze stworzeniem odpowiedniego środowiska wewnątrz macicy do podtrzymania rozwoju i umożliwienia implantacji zarodka.
  - Endometrium jest modyfikowane przez hormony i staje się receptywne dla zarodka.
  - U krów i owiec blatocysta wytwarza i uwalnia czynniki blokujące syntezę receptorów dla oksytocyny w macicy
-



**Figure 13-8.** Maternal Recognition Must Occur Prior to Luteolysis



**Conceptus Present**



Comparison between the endocrine condition of the female (timing shown here is for the cow) with no conceptus present and with conceptus present. Notice that in the pregnant animal (conceptus present), episodes of PGF<sub>2α</sub> that cause luteolysis do not occur. These are blocked because endometrial oxytocin receptor synthesis is blocked. This is called maternal recognition. Maternal recognition must occur prior to the onset of luteolysis if the pregnancy is to be maintained.

# Rozwój przedimplantacyjny

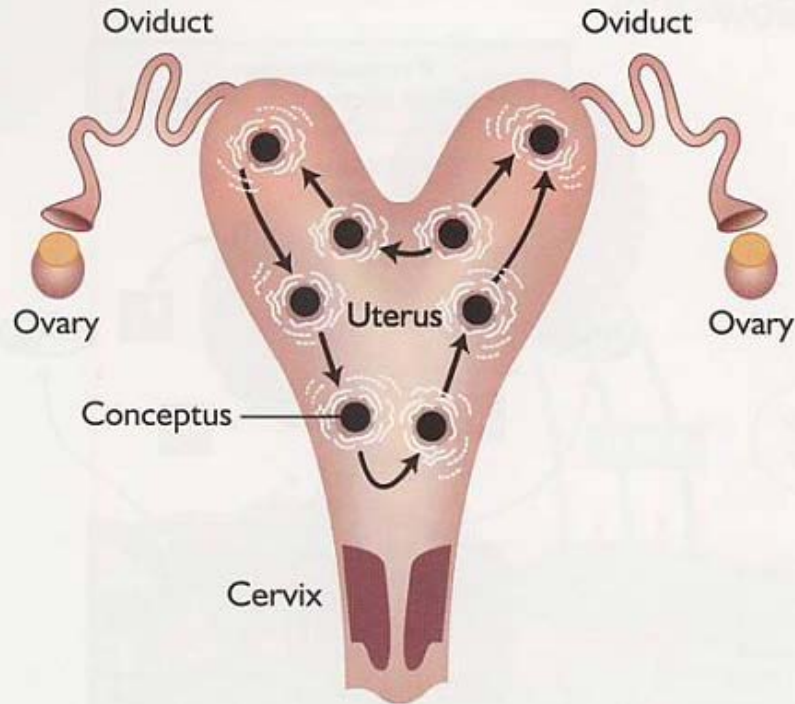
- Przedimplantacyjny rozwój zarodka normalnie następuje wewnątrz osłonki przejrzystej, chociaż jej usunięcie nie ogranicza rozwoju zarodka *in vitro*
- Nieadhezyjna natura osłonki przejrzystej sprzyja wędrówce zarodka przez jajowód i z jajowodu do macicy.
- Normalny rozwój zarodka wymaga w tym czasie obecności jajnikowych estrogenów i progesteronu, które mają wpływ na produkcję różnych czynników macicznych sprzyjających jego wzrostowi.
- Z badań *in vitro* wynika jednak, że przedimplantacyjny zarodek jest zdolny do produkcji własnych czynników promujących wzrost.
- Ostatnio stwierdzono, że macica identyfikuje zarodek przez aktywowanie ścieżki sygnałnej Wnt.

## Rozwój przedimplantacyjny

- Z badań przeprowadzonych na myszach wynika, że u tego gatunku czwartego dnia po kopulacji, tuż po wyrzucie estrogenów, blastocysta emituje sygnał, który aktywuje ścieżkę sygnałową Wnt/ $\beta$ -katenina w określonej grupie komórek warstwy okrężnej mięśniówki gładkiej miometrium, tworzących regularne pierścienie w rogach macicy.
- Blastocysta wysyła sygnał lub kilka sygnałów, które bezpośrednio lub pośrednio aktywują ścieżkę sygnałową Wnt/p-katenina w warstwie mięśniówki gładkiej.
- Macica rozpoznaje sygnał (sygnały) wzdłuż osi podłużnej rogu macicy, jeszcze przed implantacją i, co jest intrygujące, w regularnie oddzielonych odcinkach-pierścieniach .
- Liczba aktywowanych odcinków--pierścieni przewyższa liczbę zarodków stwierdzonych w rogach macicy.
- Funkcja ścieżki sygnałowej Wnt/p-katenina w komórkach mięśni gładkich macicy nie jest obecnie znana.
- **Sugeruje się, że warstwa okrężna mięśniówki gładkiej odgrywa ważną rolę we właściwym rozmieszczeniu zarodków, ponieważ aktywność systemu Wnt/p-katenina pojawia się w regularnie oddzielonych odcinkach.**

*The equine conceptus must migrate over the endometrial surface to initiate and complete maternal recognition of pregnancy.*

**Figure 13-7.** Transuterine Migration of the Equine Conceptus



Each black sphere represents a "stopping spot" in which the conceptus will spend between 5 and 20 minutes. The migration of the conceptus probably distributes pregnancy factors (white lines) over a wide surface of the endometrium.



This uterus is from a mare at day 14 of pregnancy. The uterus has been incised on the dorsal surface to expose the spherical conceptus (C). This specimen shows the conceptus and uterus on the last day (day 14) of the uterine migration phenomenon. (Photograph courtesy of Dr. O.J. Ginther, *Reproductive Biology of the Mare*)

# Rozwój przedimplantacyjny

- Pod koniec czwartego i na początku piątego dnia blastocysta aktywuje następnie ścieżkę sygnałową Wnt/p-katenina w nabłonku powierzchniowym błony śluzowej macicy.
- Najpierw ta aktywność pojawia się w mięśniówce macicy położonej przeciwległe do więzadła szerokiego, tam, gdzie następuje implantacja, a następnie jest wykrywana w nabłonku powierzchniowym.
- Już pod koniec piątego dnia aktywność ścieżki sygnałowej Wnt/p-katenina w macicy zanika.

## Rozwój przedimplantacyjny

- Obecnie jeszcze nie wiadomo, co jest pierwszym sygnałem aktywującym system Wnt/p-katenina w macicy.
- Przypuszcza się, że mogą to być białka Wnt wydzielane przez blastocystę, gdyż blastocysta myszy wykazuje ekspresję wielu genów Wnt jeszcze przed implantacją.
- Istnieje też możliwość, że blastocysta wydziela jakiś czynnik, który aktywuje ekspresję genów Wnt w nabłonku powierzchniowym endometrium, a te w autokryny sposób uczynniają ścieżkę sygnałową.
- Aktywowanie ścieżki sygnałowej Wnt/p-katenina w nabłonku powierzchniowym endometrium najprawdopodobniej powoduje modulację ekspresji genów docelowych, które pozwalają na pomyślną implantację.
- W rzeczywistości wykazano aktywację ekspresji kilku genów, jak HB-GGF i COX-2, w endometrium w obecności blastocysty, jednak ścieżka sygnałowa oraz mechanizm aktywowania tych genów pozostają nieznane.

---

Przedimplantacyjny rozwój  
zarodków *in vitro*

IVC

---

**Stadia rozwojowe zarodków niektórych gatunków zwierząt, nie kontynuujących podziałów w warunkach pozaustrojowych**

<b>Gatunek</b>	<b>Stadium „bloku” rozwoju</b>	<b>Postępowanie umożliwiające dalszy podział</b>
<b>Mysz</b>	<b>2 komórki</b>	<b>glukoza, pirogronian i mleczan w pożywce, użycie inbredowanych szczepów</b>
<b>Chomik złoty</b>	<b>2 i 4 komórki 8 komórek</b>	<b>brak glukozy i fosforanu w pożywce, dodatek glutaminy</b>
<b>Szczur</b>	<b>2 i 4 komórki</b>	<b>pożywka HECM-1</b>
<b>Królik</b>	<b>morula</b>	<b>aminokwasy w pożywce, witaminy</b>
<b>Rhesus</b>	<b>8 do 16 komórek</b>	<b>złożone pożywki + surowice</b>
<b>Krowa</b>	<b>8 do 16 komórek</b>	<b>dodatek komórek trofoblastu lub komórek jajowodu</b>
<b>Owca</b>	<b>8 do 16 komórek</b>	<b>syntetyczne pożywki (SOF), dodatek komórek trofoblastu lub komórek jajowodu</b>
<b>Świnia</b>	<b>4 komórki</b>	<b>brak pirogronianu w pożywce</b>



# Metaboliczne wymagania wczesnego zarodka ssaka

## *in vitro*

- Rozwój zarodka jest zapoczątkowany dzięki zapasom komórki jajowej gromadzonym przez lata przed i podczas jej wzrostu. Prawidłowy rozwój zależy od wielu czynników:
  - 1. Endogenna pula metabolitów.- w wielkiej mierze wynik faz końcowych dojrzewania komórki jajowej
  - 2. Metaboliczne obrót m-RNA i białek
  - 3. Czynne zużycie cukrów, aminokwasów. i prekursorowych kwasów nukleinowych
  - 4. Bierny transport, szczególnie lipidów
  - 5. Inkorporacja białek takich jak albumina może wiązać lipidy. peptydy i katecholaminy.

# Techniki IVC

---

## □ Hodowla stała

- Proste media z dodatkiem substancji energetycznych
- Kompleksowe media do hodowli komórek
- Media sekwencyjne
- Media One Step

## □ Współhodowla z komórkami somatycznymi

- Komórki nabłonka jajowodów
- Komórki linii stałych – Vero, HeLa, BRL

---

## Główne składniki płynów do hodowli zarodków

- Woda
- Jony
- Węglowodany
- Aminokwasy
- Witaminy
- Prekursory kwasów nukleinowych
- Przeciwutleniaczy
- Antibiotyki
- Białka, makrocząsteczki
- Hormony i czynniki wzrostowe
- Bufory

**Table 11.1** Composition (mM) of Simple Salt Solutions with Added Energy Substrates used in Embryo Culture

	Whitten 1957 <sup>29</sup>	Brinster 1965 <sup>30</sup>	Whitten & Biggers 1968 <sup>21</sup>	M16 1971 <sup>22</sup>	Earle's* 1971 <sup>23</sup>	HTF* 1981 <sup>26</sup>	CZB 1985 <sup>24</sup>	MTF <sup>d</sup> 1990 <sup>31</sup>	KSOM <sup>d</sup> 1993 <sup>25</sup>	Basal XI HTF* 1995 <sup>27</sup>	P1* 1998 <sup>28</sup>
<b>Component</b>											
NaCl	118.46	119.23	68.49	94.66	116.30	101.60	81.62	114.19	95.00	97.60	101.60
KCl	4.74	4.78	4.78	4.78	5.36	4.69	4.83	4.78	2.50	4.69	4.69
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1.18	1.19	1.19	1.19	-	0.37	1.18	1.19	0.35	-	-
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	-	-	-	-	1.02	-	-	-	-	-	-
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	-	1.71	-	1.71	1.80	2.04	1.70	1.71	1.71	2.04	2.04
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	1.18	1.19	1.19	1.19	0.81	0.20	1.18	1.19	0.20	0.20	0.20
NaHCO <sub>3</sub>	24.88	25.00	25.07	25.00	26.18	25.00	25.12	25.00	25.00	25.00	25.00
Ca Lactate	2.54	-	1.71	-	-	-	-	-	-	-	-
Na Lactate (D/L)	-	25.00	21.58	23.28	-	21.40	31.30	4.79	10.00a	21.4	21.4
Na Pyruvate	-	0.25	0.33	0.33	0.10	0.33	0.27	0.37	0.20	0.33	0.33
Glucose	5.55	-	5.56	5.56	5.55	2.78	-	3.40	0.20	-	-
BSA (mg/ml)	1.00	1.00	4.00	4.00	b	5.00	5.00	4.00	1.00	b	c
<b>Ratios</b>											
Na/K	24.21	28.39	19.34	24.00	26.79	29.31	23.01	24.18	45.68	30.77	31.63
Ca/Mg	2.15	1.44	1.44	1.44	2.22	10.20	1.44	1.44	8.55	10.2	10.2
L/P	-	100	70.58	70.55	-	64.85	115.93	12.95	50.00	64.85	64.85

CZB contains 110 µM EDTA, 1.0 mM glutamine, and 5.5 mM glucose after 48 h of culture from the zygote stage.

KSOM contains 10 µM EDTA and 1.0 mM glutamine.

Basal XI HTF contains 100 µM EDTA and 1.0 mM glutamine.

P1 contains 50 µM taurine and 0.5 µM citrate.

\*Used in clinical IVF.

<sup>a</sup>Sodium lactate L-isomer.

<sup>b</sup> Medium supplemented with serum of human serum albumin.

<sup>c</sup> Medium supplemented with synthetic serum substitute

<sup>d</sup> Modifications to these media have included the addition of specific groups of amino acids resulting in significant improvements to mouse zygote development in culture.

**Table 11.2** Composition of Ham's F-10 Medium<sup>32</sup>

Component	Concentration (mM)	Component	Concentration (mM)
NaCl	126.60	Leucine	0.10
KCl	3.82	Lysine	0.20
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.62	Methionine	0.03
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1.31	Phenylalanine	0.03
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.61	Proline	0.10
NaHCO <sub>3</sub>	14.28	Serine	0.10
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.30	Threonine	0.03
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	0.00001	Tryptophan	0.003
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.0030	Tyrosine	0.12
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.0001	Valine	0.03
Phenol Red	0.034	Biotin	0.0001
Sodium Pyruvate	1.00	Ca Pantothenate	0.0015
Calcium Lactate	1.00	Choline Chloride	0.005
Glucose	6.11	Cyanocobalamine	0.001
Alanine	0.10	Folic Acid	0.003
Arginine	1.21	Inositol	0.003
Asparagine	0.11	Nicotinamide	0.005
Aspartic Acid	0.10	Pyridoxine	0.001
Cysteine	0.26	Riboflavin	0.001
Glutamate	0.1	Thiamine	0.003
Glutamine	1.0	Hypoxanthine	0.03
Glycine	0.1	Lipoic Acid	0.001
Histidine	0.14	Thymidine	3.00
Isoleucine	0.02		

*Note:* Penicillin present at 100 U/ml. Streptomycin present at 50 µg/ml. Modifications as per the Center for Reproductive Medicine.

**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.

**Table 11.4** Concentration (mM) of Ions, Carbohydrates, and Glutamine in Mammalian Fluids and Embryo Culture Media

Component	Human oviduct fluid@ <sup>37,38</sup>	Human uterine fluid@ <sup>38</sup>	Human serum <sup>37</sup>	Mouse oviduct fluid <sup>31,39</sup>	HTF medium <sup>26</sup>	Ham's F-10 <sup>32</sup>	Menezo's B2/3 <sup>40</sup>	Ksom <sup>25</sup>	Basal XI <sup>27</sup>	G1 <sup>33,34</sup>	G2 <sup>33,34</sup>
Na	130	nd	145	139	148	143	129	130.2	144.3	122.0	122.0
Cl	132	nd	nd	165	110	131	114	106.4	106.4	94.3	94.3
K	21.2	nd	5.0	23.4	5.1	4.4	9.8	2.85	4.70	5.50	5.50
Ca	1.13	nd	1.13	1.71	2.04	0.30	0.56	1.71	2.04	1.80	1.80
Mg	1.42	nd	2.00	1.04	0.20	0.62	0.81	0.2	0.2	1.0	1.0
S	12.3	nd	nd	8.45	0.20	0.62	0.17	0.2	0.2	1.0	1.0
P	8.69	nd	nd	8.93	0.37	1.92	0.90	0.35	-	0.5	0.5
Pyruvate	0.32	0.10	0.10	0.37	0.33	1.00	2.27	0.20	0.33	0.32	0.10
L-Lactate	10.50	5.87	0.60	4.79	-	-	-	10.0	-	10.5	5.87
D/L-Lactate	-	-	-	-	21.4	2.23	0.56	-	21.4	-	-
Glucose	0.50	3.15	5.00	3.40	2.78	6.11	6.67	0.2	0.00	0.50	3.15
Glutamine	0.30	nd	nd	0.20	0.00	0.30	0.17	1.0	1.0	1.0	1.0
<b>Ratios</b>											
Na/K	6.1	-	29.0	5.9	29.31	32.5	13.1	45.68	30.7	22.18	22.18
Ca/Mg	0.80	-	0.57	1.64	10.2	0.48	0.69	8.55	10.2	1.8	1.8
L/P	32.81	58.7	6.00	12.95	64.85	2.23	0.25	50.0	64.85	32.81	58.7

® Mid-cycle.

**Table 5.4.** Composition of synthetic oviductal fluid – original formulation (from Tervit *et al.*, 1972) and a modified SOF formulation (from Takahashi and First, 1992).

Original		Modified	
Constituent	Concentration	Component	Concentration
NaCl	107.70 mM	NaCl	107.70 mM
KCl	7.16 mM	KCl	7.16 mM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1.71 mM	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1.19 mM
MgCl <sub>2</sub>	0.49 mM	CaCl <sub>2</sub>	1.71 mM
CaCl <sub>2</sub>	1.71 mM	MgCl <sub>2</sub>	0.49 mM
NaHCO <sub>3</sub>	25.07 mM	NaHCO <sub>3</sub>	25.07 mM
Na lactate	3.30 mM	Sodium lactate	3.30 mM
Na pyruvate	0.33 mM	Sodium pyruvate	0.30 mM
Glucose	1.50 mM	BSA <sup>a</sup>	3.0 mg ml <sup>-1</sup>
BSA	32 mg ml <sup>-1</sup>	Phenol red	1.3 µg ml <sup>-1</sup>
Penicillin	100 iu ml <sup>-1</sup>	Gentamicin sulfate	50.0 µg ml <sup>-1</sup>
Streptomycin	50 µg ml <sup>-1</sup>		
pH – 7.2 to 7.4			
270 mosm			

<sup>a</sup> Crystallized and lyophilized; the osmolarity and pH of mSOF are 270–280 mosm and 7.2 to 7.3, respectively.



Table 1. Composition of a selection of media which have been used under defined or semi-defined conditions for both bovine and ovine embryo culture.

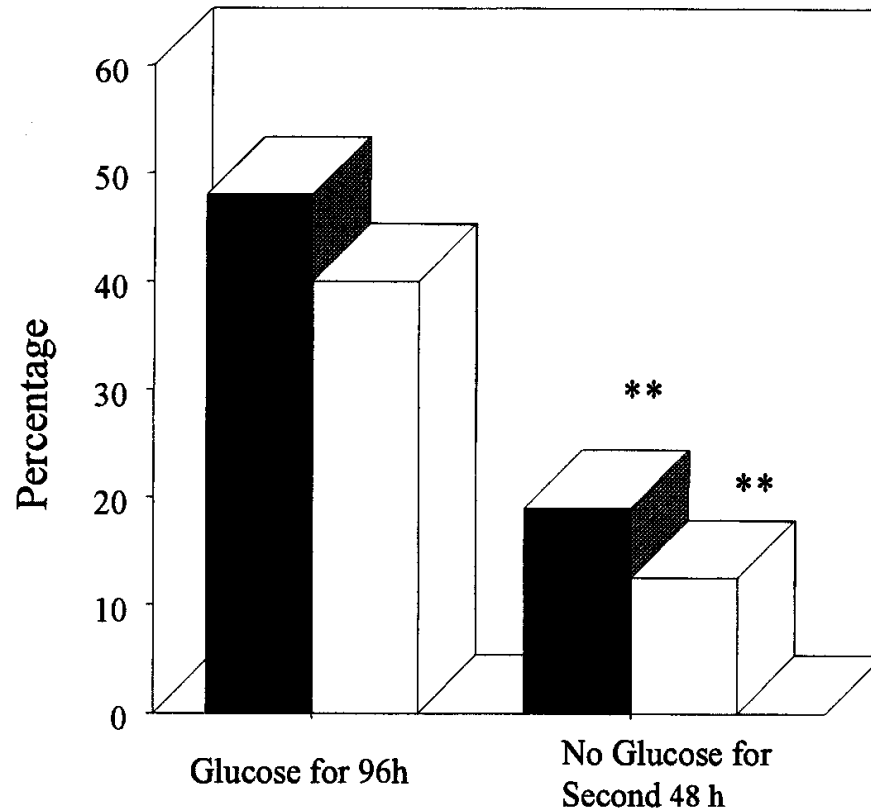
Component <sup>a</sup>	CDM (69)	CR1 (67)	CZB (15)	HECM (68)	SOFaaBSA(29)
NaCl	81	114.7	81.62	98.0	107.7
KCl	8	3.1	4.83	3.2	7.16
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>			1.18		1.19
MgCl <sub>2</sub>	0.5			0.5	0.48
MgSO <sub>4</sub>			1.18		
NaHCO <sub>3</sub>	25	26.2	25.12	25.0	25.0
CaCl <sub>2</sub>	2		1.7	2.0	1.71
Na pyruvate	0.5	0.4	0.27	0.5	0.33
Na lactate	5		31.3	10	3.3
Ca lactate		5			
Glucose	2				1.5
Glutamine	1	1	1	1	1.0
Ess. aa	MEM	BME		mixed	MEM
Non-ess aa	MEM+5mM gly	MEM		mixed	MEM
EDTA	0.1		0.11		
BSA (mg/ml)		3	4		8
PVA (mg/ml)	0.1			1	

<sup>a</sup>Antibiotics are not included in the table, but are routinely used.

**Table 11.3** Composition of a Sequential Medium<sup>18,33,34</sup>

Component	G1 Concentration (mM)	G2 Concentration (mM)
NaCl	85.16	85.16
KCl	5.5	5.5
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.5	0.5
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	1.0	1.0
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	1.8	1.8
NaHCO <sub>3</sub>	25.0	25.0
Sodium Pyruvate	0.32	0.10
Sodium Lactate (L)	10.5	5.87
Glucose	0.5	3.15
Alanine	0.1	0.1
Aspartic Acid	0.1	0.1
Asparagine	0.1	0.1
Arginine	-	0.6
Cystine	-	0.1
Glutamate	0.1	0.1
Glutamine	1.0	1.0
Glycine	0.1	0.1
Histidine	-	0.2
Isoleucine	-	0.4
Leucine	-	0.4
Lysine	-	0.4
Methionine	-	0.1
Phenylalanine	-	0.2
Proline	0.1	0.1
Serine	0.1	0.1
Taurine	0.1	-
Threonine	-	0.4
Tryptophan	-	0.5
Tyrosine	-	0.2
Valine	-	0.4
EDTA	0.01	-
HSA	5 mg/ml	5 mg/ml
Phenol Red	0.001g/l	0.001g/l

Note: Penicillin present at 100 U/ml.

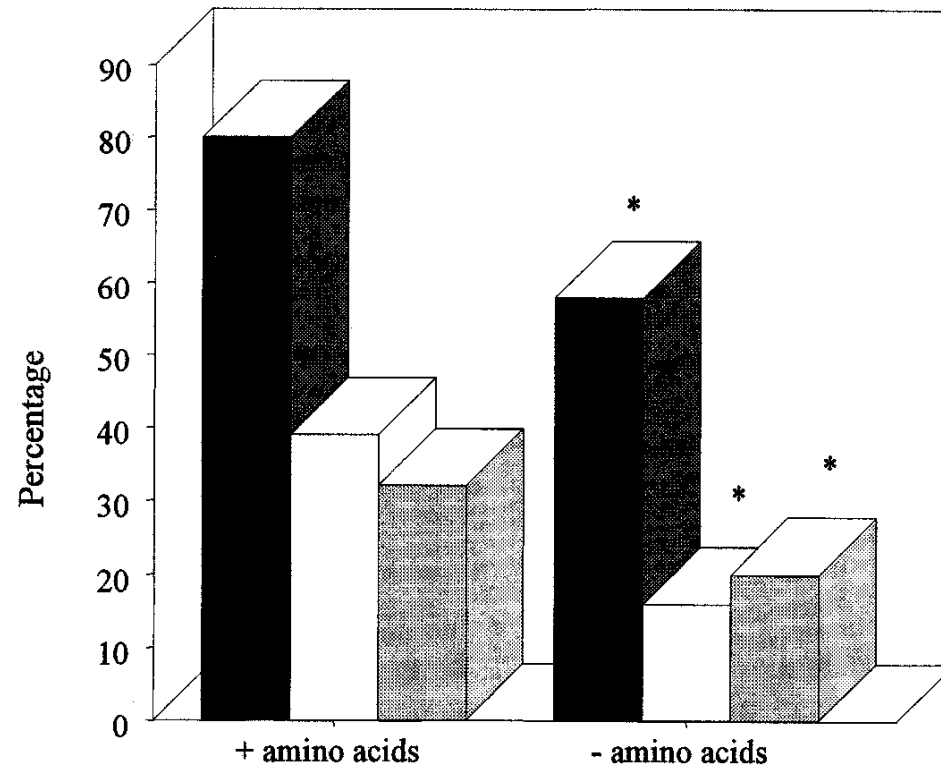


**Figure 11.1** Effect of culture of CF1 mouse embryos with glucose on subsequent implantation and fetal development rates. Zygotes were cultured in media DM2/DM1 containing glucose for the entire 96 h culture period, or cultured in medium without glucose for the second 48 h of culture. Resultant blastocysts were transferred to pseudopregnant recipients and implantation and fetal development assessed. Data from Gardner and Lane.<sup>98</sup>

Solid bars represent implantation per embryo transferred.

Open bars represent fetal development per embryo transferred.

\*\*Significantly reduced compared to culture for 96 h with glucose ( $P < 0.01$ ).



**Figure 11.2** Effect of collection of CF1 mouse zygotes in medium without amino acids on subsequent development. Zygotes were collected in medium either containing nonessential amino acids and glutamine or in the same medium without the amino acids. Embryos were in the collection medium for less than five minutes. Data from Gardner and Lane.<sup>98</sup>

Solid bars represent morula/blastocyst development.

Open bars represent blastocyst development.

Shaded bars represent blastocyst hatching.

\*Significantly reduced compared to collection with amino acids ( $P < 0.05$ ).

**Table 11.5** Composition of Eagle's Amino Acids (mM)<sup>116</sup>

Nonessential		Essential	
alanine	0.1	arginine	0.6
asparagine	0.1	cystine	0.1
aspartate	0.1	glutamine	2.0*
glycine	0.1	histidine	0.2
glutamate	0.1	isoleucine	0.4
proline	0.1	leucine	0.4
serine	0.1	lysine	0.4
		methionine	0.1
		phenylalanine	0.2
		threonine	0.4
		tryptophan	0.5
		tyrosine	0.2
		valine	0.4

\* Glutamine is frequently used at a concentration of 0.5 to 1 mM in embryo culture media.

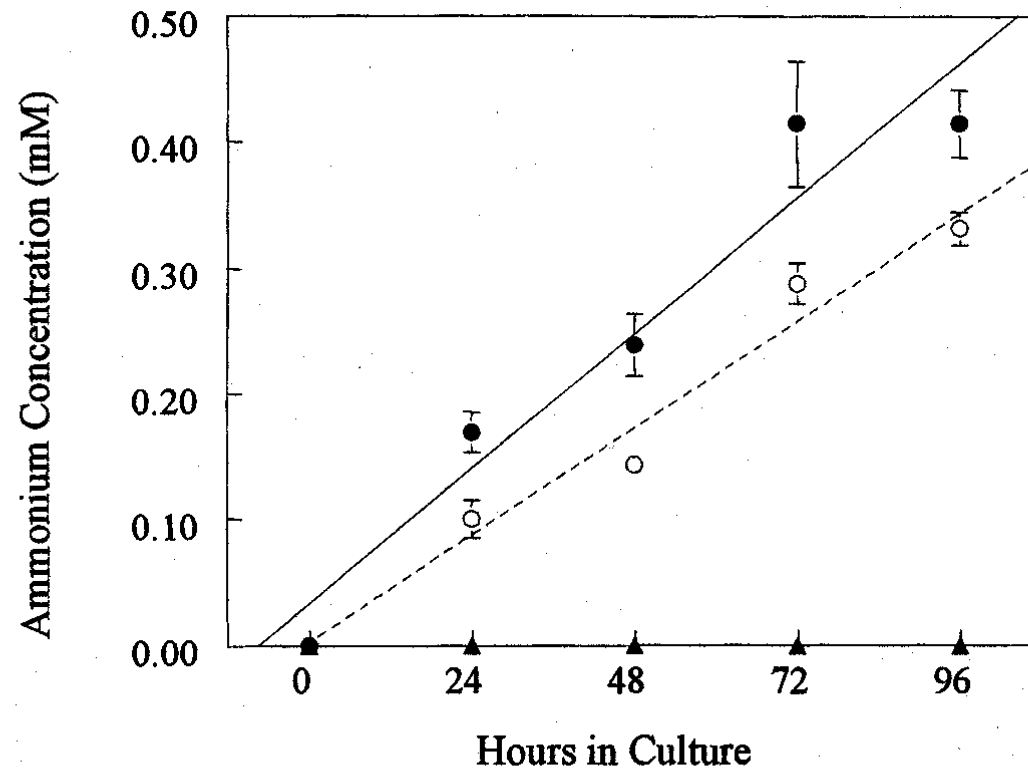
**Table 11.6** Effect of Amino Acids on Development of Mouse Zygotes Cultured for 72 h

Amino acids	Stage of Development Reached (%)					Total
	<Morula	Morula	Early blastocyst	Expanded blastocyst	Hatching blastocyst	
None	0	78 <sup>a</sup>	22	0	0	22 <sup>a</sup>
Nonessential	6	6 <sup>ab</sup>	18	36	34	88 <sup>ab</sup>
Essential	8	70 <sup>b</sup>	18	4	0	22 <sup>b</sup>

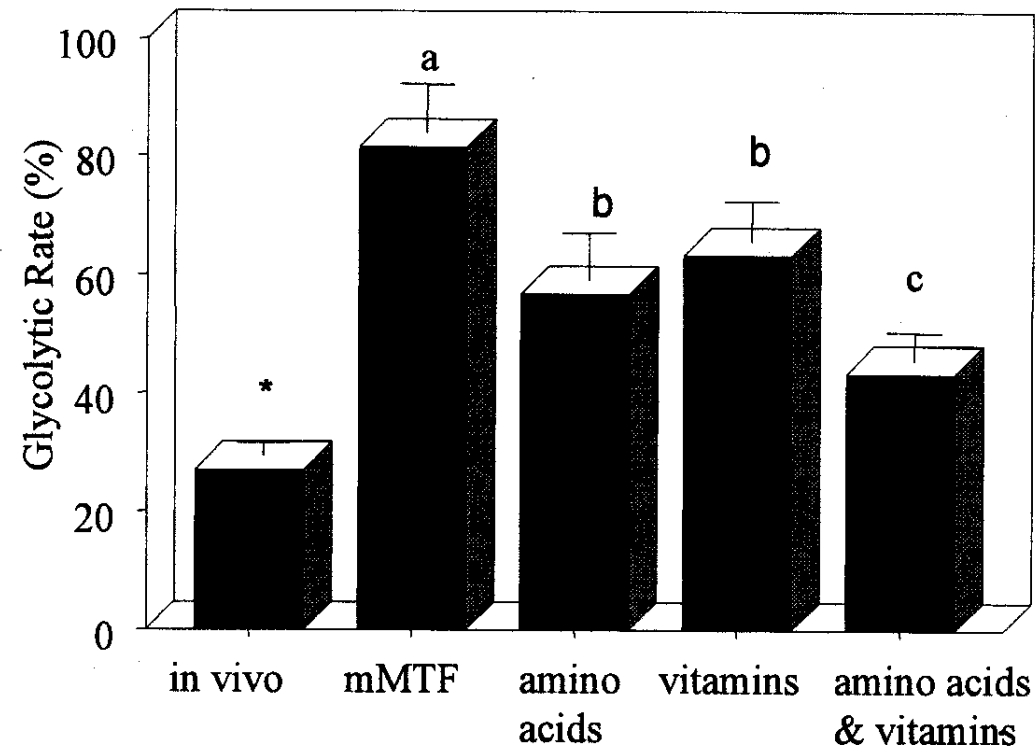
Base medium was modified mouse tubal fluid medium.

Like pairs are significantly different: a,b,  $P < 0.01$ .

Data from Gardner and Lane.<sup>119</sup>



*Figure 11.3* Ammonium production in culture media incubated at 37°C. Levels of ammonium production were examined in medium without amino acids (closed triangles); medium containing amino acids (open circles) and in culture medium containing amino acids and mouse embryos (closed circles). There was no detectable ammonium production in the medium without amino acids. Ammonium production increased linearly over time in the media containing amino acids. The level of ammonium production was increased when the embryos were also in the culture drop. Data from Gardner and Lane.<sup>119</sup>



**Figure 11.4** Effect of amino acids and vitamins on blastocyst metabolism. Mouse blastocysts developed in vivo have a low level of aerobic glycolysis. Culture for 6 h in a simple medium lacking amino acids and vitamins (mMTF) results in an abnormal increase in glycolysis that is associated with reduced viability. Addition of amino acids or vitamins to the medium reduces this perturbation in metabolism. Amino acids and vitamins act in synergy to further reduce this increase in glycolysis. Data from Lane and Gardner.<sup>96</sup>

<sup>a-c</sup>Different superscripts are significantly different ( $P < 0.05$ ).

\*Significantly different to all culture treatments.



---

**Table 7.4.** Growth factors related to reproduction in the cow.

Growth factor	Principal functions
Epidermal growth factor (EGF)	EGF is a polypeptide with potent mitogenic activity in various types of cells
Fibroblast growth factor (FGF)	Stimulates the growth of blood vessels as well as being mitogenic
Platelet-derived growth factor (PDGF)	Is a polypeptide with potent mitogenic activity
Platelet-activating factor (PAF)	A potent phospholipid mediator that induces a wide range of physiological responses
Insulin-like growth factors (IGFs)	Are polypeptide growth factors that mediate most of the growth-promoting actions of growth hormone
Transforming growth factor (TGF- $\alpha$ and TGF- $\beta$ )	Is closely related to EGF; produced by theca cells
Tumour necrosis factor (TNF)	Traditionally associated with inflammation

**Table 5.8.** The effect of media and sera on the *in vitro* development of bovine embryos to the blastocyst stage (from Wang, 1991).

Treatments	No. embryos (2-8 cells)	Blastocysts (%)
M-199 + 20% OCS	146	40.4 (59/146) <sup>c</sup>
M-199 + 20% FCS	140	25 (35/140) <sup>b</sup>
HF <sub>10</sub> + 20% OCS	131	20.6 (27/131) <sup>b</sup>
HF <sub>10</sub> + 20% FCS	123	2.4 (3/123) <sup>a</sup>

Total of nine trials.

a b c:  $P < 0.01$ .

**Table 5.9.** The effect of oestrous cow serum (OCS) concentration on the *in vitro* development of bovine embryos to the blastocyst and hatched blastocyst stage (from Wang, 1991).

OCS conc. %	0	5	10	20
No. of embryos	359	331	366	444
Blastocysts	94	152	191	219
%	26.2 <sup>a</sup>	45.9 <sup>b</sup>	52.2 <sup>b</sup>	49.3 <sup>b</sup>
No. of blastocysts	92	141	177	202
Hatched blastocysts	69	109	157	165
%	75.0 <sup>A</sup>	77.3 <sup>A</sup>	88.7 <sup>B</sup>	81.7 <sup>A,B</sup>

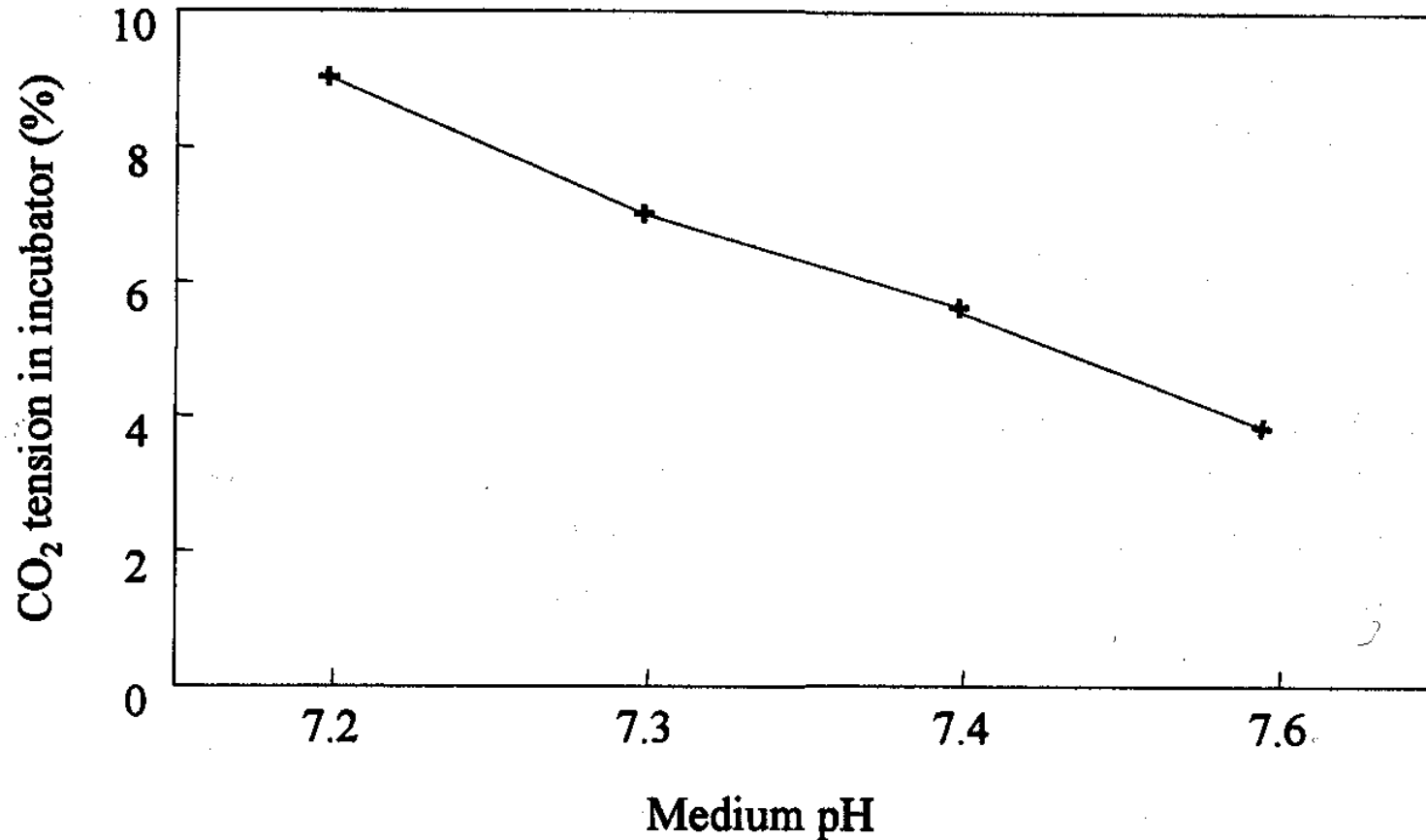
Total of five trials; the basic medium was medium 199 with Earl's salts.

a b:  $P < 0.01$ , AB:  $P < 0.01$ .

# Warunki hodowly

---

- Tlen
- Dwutlenek węgla
- Temperatura
- Inkubator/komora inkubatora
- Światło
- Objętość płynu/grupowanie zarodków



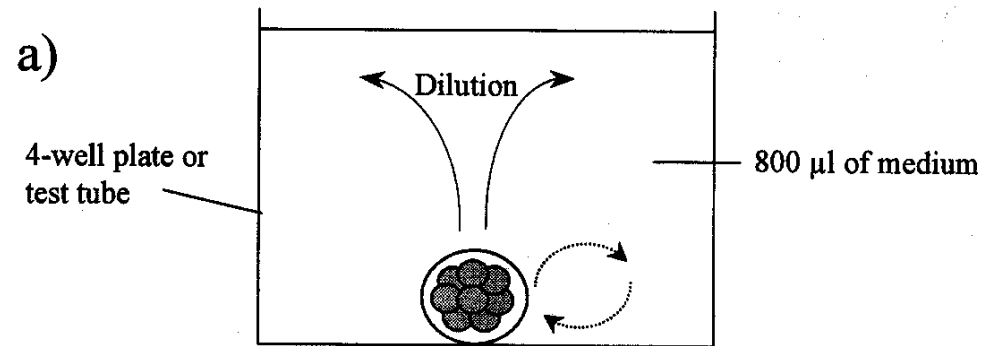
**Figure 11.6** Henderson-Hasselbach equation;  $\text{pH} = \text{pK}_a + \log_{10} \left( \frac{[\text{HCO}_3^-]}{[\text{CO}_2]} \right)$ . To maintain the external pH of the culture medium at 7.4 it is necessary to have incubators gassed with around 5.5% CO<sub>2</sub>. Therefore, it would seem prudent to operate incubators between 5.5 to 6.5% to ensure an external pH of between 7.4 to 7.25.

**Tableau 2 — Développement embryonnaire sous différentes concentrations de CO<sub>2</sub>**

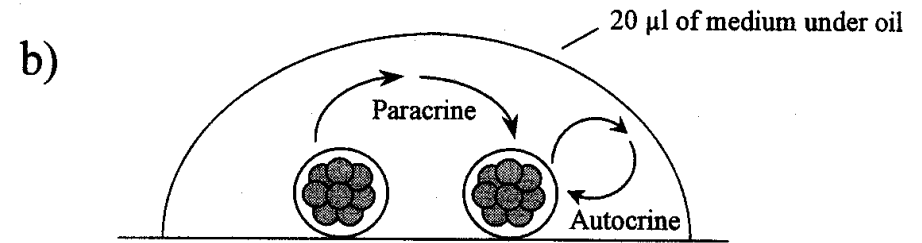
Concentration de CO <sub>2</sub>	pH mesuré	NB d'œufs cultivés	% blastocytes/ NB d'œufs cultivés (min-max)
3,5 %	7,45	549	48 <sup>a</sup> (43 à 53)
5,0 %	7,30	585*	43 <sup>b</sup> (40 à 45)
5,0 %	7,30	309*	47 <sup>c</sup> (40 à 53)
7,5 %	7,15	297	37 <sup>d</sup> (37 à 45)

\* Deux répétitions (un total de 139 zygotes) dans les groupes, 5 % étaient communs aux deux séries.  
SAS Gemnod P > 0,08 ( a vs b) et P < 0,008 (c vs d).

## Effect of incubation volume and embryo grouping on embryo development and differentiation



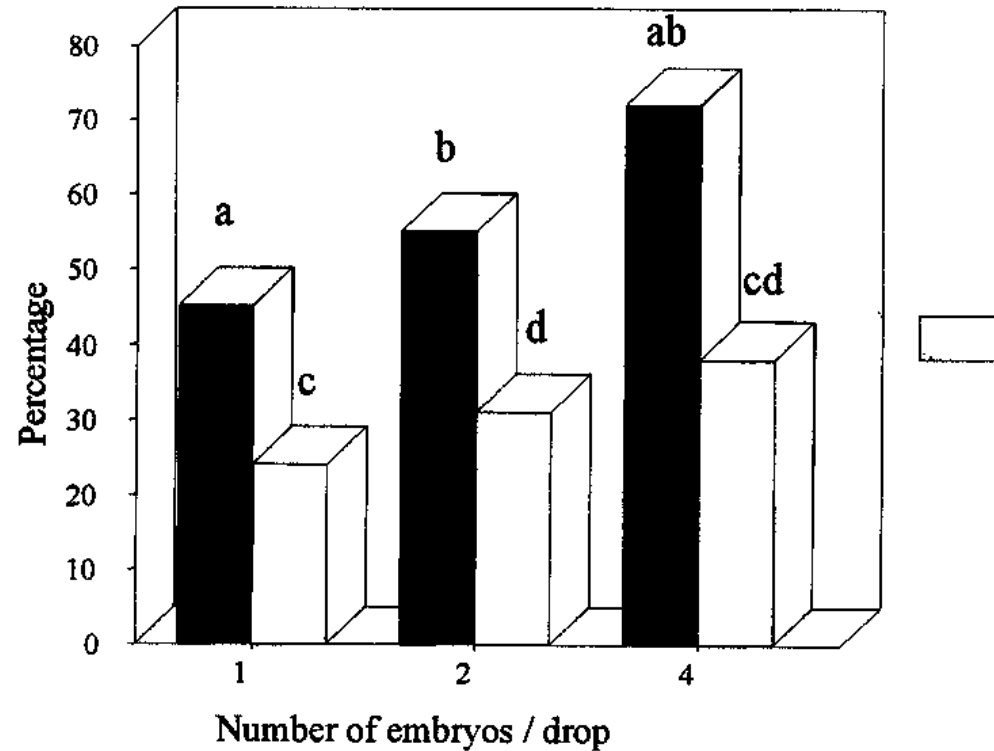
(a) A single embryo cultured in a four-well plate or test-tube, any factor produced by the embryo will become ineffectual as a result of dilution.



(b) Culture of embryos in reduced volumes and/or groups increases the effective concentration of embryo-derived factors, facilitating their action in either a paracrine or autocrine manner.

## Effect of incubation volume and embryo grouping on embryo development and differentiation

c)



(c) Effect of embryo grouping on bovine blastocyst development and differentiation. Bovine embryos were cultured either individually or in groups of two or four in 50  $\mu$ l drops of medium. Solid bars, percent blastocyst; open bars, percent ICM/Total. Like pairs are significantly different ( $P < 0.05$ )

**Table 7.14.** IVP embryo production with single or group embryo culture. IVP results using either one or 35 oocytes/embryos per well. The number of oocytes were 413 for single and 414 for group culture. (From Hendriksen *et al.*, 1999b.)

	% cleaved <sup>a</sup>	% blast. day 7 <sup>a</sup>	% blast.day 9 <sup>a</sup>	% hatching day 11 <sup>b</sup>	% blast./cleaved
Single	67*	14*	23**	68**	34**
Group	74	20	33	82	45

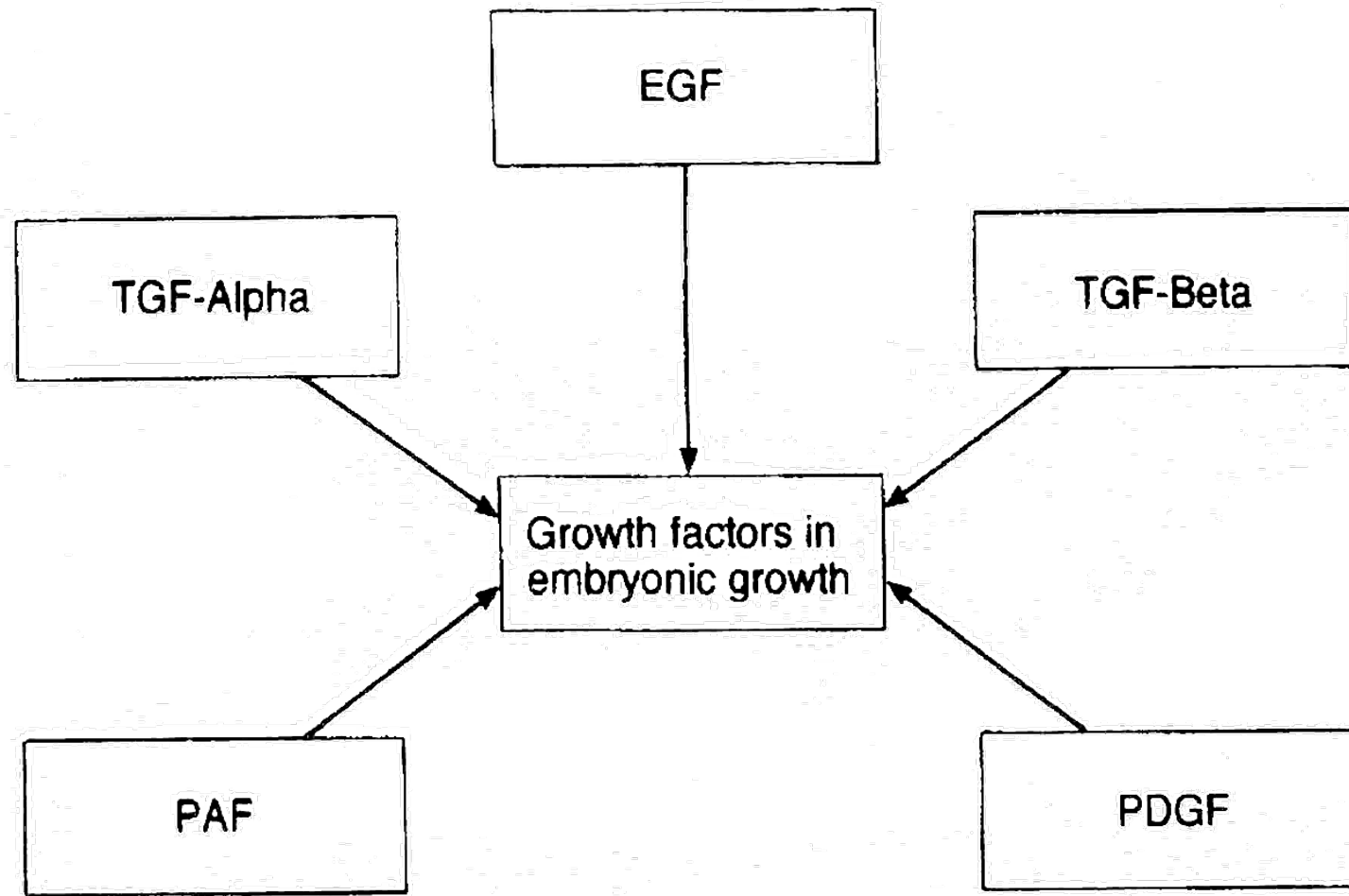
<sup>a</sup>Of oocytes after IVF.

<sup>b</sup>Of blastocysts at day 9.

**Table 7.15.** Embryo production in relation to group size. Total number of tested embryos and survival rates at first cleavage, morula, blastocyst, hatching blastocyst stages (data shown as mean %  $\pm$  SEM). (From Yuan *et al.*, 2000.)

Group	Total embryos tested	Cleavage rate	Morula rate	Blastocyst rate	Hatched blastocyst rate
S1	457	56.5 <sup>a</sup> $\pm$ 7.2	19.4 <sup>a</sup> $\pm$ 5.2	3.4 <sup>a</sup> $\pm$ 2.5	0.3 <sup>a</sup> $\pm$ 0.3
S5	549	67.5 <sup>a</sup> $\pm$ 7.1	29.0 <sup>b</sup> $\pm$ 3.9	14.5 <sup>b</sup> $\pm$ 1.8	6.0 <sup>b</sup> $\pm$ 1.9
S25	535	71.5 <sup>a</sup> $\pm$ 4.3	36.5 <sup>c</sup> $\pm$ 4.8	17.8 <sup>b</sup> $\pm$ 2.6	15.9 <sup>c</sup> $\pm$ 3.3





**Fig. 5.8.** Growth factors in embryo growth and development.

**Table 7.6.** Development of *in vitro* or *in vivo*-produced zygotes in a bovine oviductal cell co-culture system (from McCaffrey *et al.*, 1991).

	<i>In vivo</i>	Day 1 IVF	Day 2 IVF
No. of ova	41	77	52
Initial ovum cell no. (mean $\pm$ SEM)	2.47 $\pm$ 0.52	1.04 $\pm$ 0.03	4.9 $\pm$ 0.35
No. of morulae/blastocysts (%)	32 (78) <sup>a</sup>	28 (36) <sup>b</sup>	13 (25) <sup>b</sup>
No. of grade 1 and 2 mor./blast. (%)	20 (62) <sup>a</sup>	9 (32) <sup>a</sup>	3 (23) <sup>b</sup>

**Table 7.7.** Development of IVF bovine embryos co-cultured with different cell types (from Tavares *et al.*, 2000).

Cell type	Cultivated	Cleavage (%)	Blastocyst (%)
Oviductal	1068	829 (77.6)	174 (16.3)
Granulosa	1632	1071 (65.6)	213 (13.0)
VERO	392	277 (70.7)	28 (7.1)
BRL	406	288 (70.9)	29 (7.1)
Total	3498	2465 (70.5)	444 (12.7)

Table 3. Effect of coculture cell type on blastocyst yield, cell number and sex ratio of the embryos (34).

Cell type	Inseminated	BLASTS D8	No. cells	No. male / No. sexed
BOEC	1110	210 (19%)	99 ± 4.1 a	87 / 141 (61.7%)
Vero	1072	189 (17.6%)	108.7 ± 3.7 b	87 / 144 (60.4%)

a vs b  $p < 0.05$ , ANOVA, 10 replicates.

**Table 5.12.** Effect of preconditioned medium on the *in vitro* development of bovine embryos to the blastocyst stage (from Wang, 1991).

Treatments	Medium alone	Oviductal cell monolayers	Conditioned medium
No. of embryos	69	617	68
Blastocysts	11	174	22
%	15.9 <sup>a</sup>	28.2 <sup>b</sup>	31.3 <sup>b</sup>

Total of four trials; the basic medium was M-199 + 20% OCS.

a b:  $P < 0.05$ .

**Table 5.13.** Effect of blastocyst-conditioned medium (BCM) on the development of the early bovine embryo (from Shi, 1991).

Treatments	Embryos cult.	Blastocysts developed (%)
Control	349	168 (48.1) <sup>b</sup>
BCM on day 3	349	194 (55.6) <sup>a</sup>
BCM on day 0	349	207 (59.3) <sup>a</sup>

Data shown in the table are from four replicates.

a, b: Values with different superscripts are different ( $P < 0.05$ ).

---

**Table 10.1** Cell Types Used In Human Embryo Coculture Systems

---

<b>Donor cells:</b>	<b>Heterologous</b>
	Human tubal epithelial
	Human endometrium
	Bovine fetal uterine
	Bovine oviductal epithelial (BOEC)
	African green monkey kidney epithelial cells (Vero)
	Madin-Darby bovine kidney epithelial cells (MDBK)
	Ovarian cancer cells
<b>Patient's own cells:</b>	<b>Autologous</b>
	Human granulosa
	Human cumulus
	Human endometrium

---

**Table 5.19.** Cell numbers in *in vitro*-produced bovine embryos (from Lonergan, 1992).

		<i>n</i>	Cell number
Day 6	Early morula	6	28.00 ± 5.21
	Morula	16	50.37 ± 17.65
	Late mor./early bl.	7	62.00 ± 22.80
Day 7	Late mor./early bl.	12	71.92 ± 28.01
	Early blastocyst	13	96.85 ± 47.30
	Blastocyst	26	120.35 ± 39.53
	Expanding bl.	16	130.56 ± 48.05
	Expanded bl.	3	191.00 ± 29.50
Day 8	Blastocyst	16	131.31 ± 41.87
	Expanded bl.	5	169.4 ± 18.95
	Hatched bl.	8	185.75 ± 51.64
Day 9	Blastocyst	59	117.15 ± 42.40
	Expanded bl.	8	105.00 ± 31.72
	Hatched bl.	12	204.40 ± 59.14



**Table 7.8.** Effect of B2 and TCM-199 media on IVP bovine embryo development (from Fancsovits *et al.*, 1998b).

Treatment	<i>n</i>	Cleavage (%)	8–16-cell (%) <sup>a</sup> – day 4	Blastocyst (%) <sup>a</sup> – day 7	Cell number ± SD – day 7 blastocysts
INRA-B2	176	91	84	35 <sup>b</sup>	119 <sup>d</sup> ± 39
TCM-199	274	90	78	27 <sup>c</sup>	90 <sup>e</sup> ± 32

<sup>a</sup>Percentage of cleaved embryos.

**Table 7.9.** Culture of IVP cattle embryos in different media +5% FCS (from Tavares *et al.*, 2002).

	Number of oocytes	Cleavage (%)	Blastocyst (%)	Hatched (%)
CR2aa	387	322 (83.2) <sup>a</sup>	128 (33.1) <sup>a</sup>	123 (31.8) <sup>ab</sup>
KSOMaa	285	195 (68.4) <sup>b</sup>	123 (43.2) <sup>b</sup>	106 (37.2) <sup>b</sup>
SOFaa	246	199 (80.9) <sup>a</sup>	113 (45.9) <sup>b</sup>	60 (24.4) <sup>a</sup>

**Table 7.10.** Effect of serum concentration in SOFaa medium on IVP embryo development (from Assumpcao *et al.*, 2002).

	Number of oocytes	Cleavage <i>n</i> (%)	Blastocyst <i>n</i> (%)	Hatched <i>n</i> (%)
SOFaa	246	199	113	60
5% FCS		(80.9)	(45.9)	(24.4) <sup>a</sup>
SOFaa	223	179	111	101
7.5% FCS		(80.3)	(49.8)	(45.3) <sup>b</sup>

**Table 7.11.** Effect of changing KSOM + BSA on day 4 to SOFaaci + 5% FCS (from Nedambale *et al.*, 2002).

Culture treatment	Number of oocytes ( <i>n</i> )	Day 5 morulae (%)	Day 6 early blastocysts (%)	Day 8 blastocysts (%)	Day 8 hatched blastocysts (%)
1 (SOFaaci + FCS)	242	43 ± 4.05 <sup>a</sup>	25 ± 2.02 <sup>a</sup>	47 ± 3.44 <sup>a</sup>	63 ± 5.38 <sup>ab</sup>
2 (S + FCS to K + FCS)	242	43 ± 4.05 <sup>a</sup>	21 ± 2.02 <sup>a</sup>	42 ± 3.44 <sup>a</sup>	54 ± 5.38 <sup>a</sup>
3 (KSOM + BSA)	242	36 ± 4.05 <sup>a</sup>	9 ± 2.02 <sup>b</sup>	40 ± 3.44 <sup>a</sup>	67 ± 5.38 <sup>ab</sup>
4 (K + BSA to S + FCS)	242	46 ± 4.05 <sup>a</sup>	24 ± 2.02 <sup>a</sup>	44 ± 3.44 <sup>a</sup>	83 ± 5.38 <sup>b</sup>

<sup>a,b</sup>Values with different superscripts within columns are significantly different ( $P < 0.01$ ).

5, SOFaaci; K, KSOM.

**Table II.** The effect of stage, age and morphological grade of bovine IVF-derived embryos upon pregnancy rates following transfer into Holstein heifers

Embryo stage	No. transfers (% pregnant)			
	Day 7		Day 8	
	Grade 1	Grade 2	Grade 1	Grade 2
Morula	335 (45)	83 (31)	1 (0)	2 (0)
Blastocyst				
Early	1114 (53) <sup>a</sup>	259 (36) <sup>b</sup>	31 (39)	30 (27)
Mid	1305 (56) <sup>a</sup>	296 (46) <sup>b</sup>	96 (49)	45 (31)
Expanded	1069 (63)	54 (57)	188 (47) <sup>a</sup>	24 (33) <sup>d</sup>
Hatched	91 (57)	-	45 (45)	-
Total	3914 (56) <sup>a</sup>	692 (41) <sup>c</sup>	361 (48) <sup>a</sup>	101 (30) <sup>b</sup>

<sup>a-d</sup>Values in rows within days differ significantly (a versus b:  $P < 0.01$ , a versus c:  $P < 0.001$ , a versus d, b versus c:  $P < 0.05$ ).

From Hasler *et al.* (1995).

**Table 5.8.** The effect of media and sera on the *in vitro* development of bovine embryos to the blastocyst stage (from Wang, 1991).

Treatments	No. embryos (2-8 cells)	Blastocysts (%)
M-199 + 20% OCS	146	40.4 (59/146) <sup>c</sup>
M-199 + 20% FCS	140	25 (35/140) <sup>b</sup>
HF <sub>10</sub> + 20% OCS	131	20.6 (27/131) <sup>b</sup>
HF <sub>10</sub> + 20% FCS	123	2.4 (3/123) <sup>a</sup>

Total of nine trials.  
a b c:  $P < 0.01$ .

**Table 5.9.** The effect of oestrous cow serum (OCS) concentration on the *in vitro* development of bovine embryos to the blastocyst and hatched blastocyst stage (from Wang, 1991).

OCS conc. %	0	5	10	20
No. of embryos	359	331	366	444
Blastocysts	94	152	191	219
%	26.2 <sup>a</sup>	45.9 <sup>b</sup>	52.2 <sup>b</sup>	49.3 <sup>b</sup>
No. of blastocysts	92	141	177	202
Hatched blastocysts	69	109	157	165
%	75.0 <sup>A</sup>	77.3 <sup>A</sup>	88.7 <sup>B</sup>	81.7 <sup>A,B</sup>

Total of five trials; the basic medium was medium 199 with Earl's salts.  
a b:  $P < 0.01$ , AB:  $P < 0.01$ .

**Table 5.1.** Development of one- to four-cell bovine embryos on an oviductal cell monolayer (from McCaffrey *et al.*, 1990).

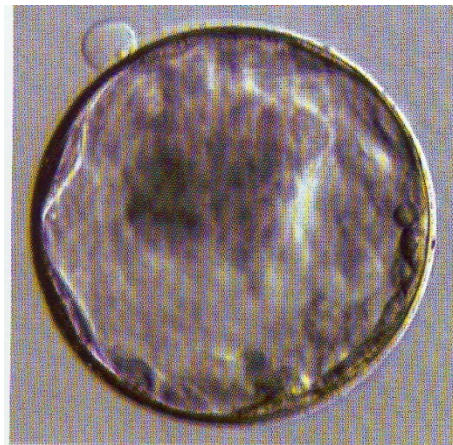
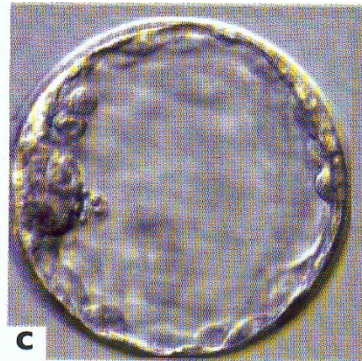
	Control	BOEC-0	BOEC-3
<i>n</i>	32	46	37
Initial cell stage of ova ( $M \pm SE$ )	$2.00 \pm 0.16$	$2.19 \pm 0.14$	$2.38 \pm 0.18$
No. ova $\geq$ 16-cell (%)	16 (50)	36 (78)	30 (81)
No. morulae/blastocysts (%)	0 (0)	36 (78)	30 (81)
No. of grade 1 and 2 ova (%)	0 (0)	31 (67)	26 (70)

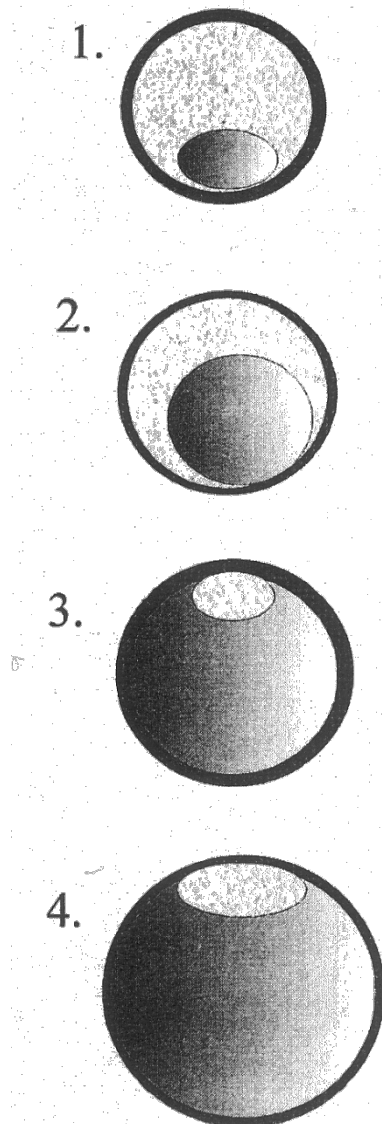
BOEC-0, culture dishes seeded with bovine epithelial cells on day of ovum recovery;  
 BOEC-3, culture dishes seeded 3 days prior to start of embryo culture.

**Table 5.19.** Cell numbers in *in vitro*-produced bovine embryos (from Lonergan, 1992).

		<i>n</i>	Cell number
Day 6	Early morula	6	28.00 ± 5.21
	Morula	16	50.37 ± 17.65
	Late mor./early bl.	7	62.00 ± 22.80
Day 7	Late mor./early bl.	12	71.92 ± 28.01
	Early blastocyst	13	96.85 ± 47.30
	Blastocyst	26	120.35 ± 39.53
	Expanding bl.	16	130.56 ± 48.05
	Expanded bl.	3	191.00 ± 29.50
Day 8	Blastocyst	16	131.31 ± 41.87
	Expanded bl.	5	169.4 ± 18.95
	Hatched bl.	8	185.75 ± 51.64
Day 9	Blastocyst	59	117.15 ± 42.40
	Expanded bl.	8	105.00 ± 31.72
	Hatched bl.	12	204.40 ± 59.14







**System Oceny ludzkich blastocyst. Ocena według liczbowego systemu od 1 do 6, opartego na ich stopnia rozszerzeniu oraz stanie wylęgania:**

1. Wczesna blastocysta: blastocel wypełnia mniej niż pół objętości zarodka.
2. Blastocysta: blastocel wypełnia więcej niż pół objętości zarodka.
3. Pełna blastocysta: blastocel wypełnia cały zarodek.
4. Rozszerzona blastocysta: objętość blastocelu jest większa niż ta z wczesnego zarodka, osłonka przejrzysta cienieje.
5. Wylęgająca się blastocysta: tworzy się przepuklina trofoektoderma wychodząc przez osłonkę.
6. Wylęgana blastocysta: blastocysta całkowicie wydostaje się z osłonki przejrzystej.

Początkowa faza szacowania może być wykonywana przy pomocy stereomikroskopu. Drugi etap oceny blastocysty powinien być wykonywany przy pomocy mikroskopu o odwróconej optyce. Rozwój wężła zarodkowego i trofoektodermy może być szacowany dla blastocyst klasyfikowanych do punktów od 3 do 6 (to jest, pełny blastocysty i dalsze etapy)

**Klasyfikacja wężła zarodkowego**

- A. Ciasno pakowany, wiele komórek.
- B. Luźno grupowany, kilka komórek.
- C. Bardzo mało komórek

**Klasyfikacja trofoektodermy**

- A. Wiele komórek kształtujących ciasny nabłonek.
- B. Mało komórek.
- C. Bardzo mało komórek kształtujących luźny nabłonek.

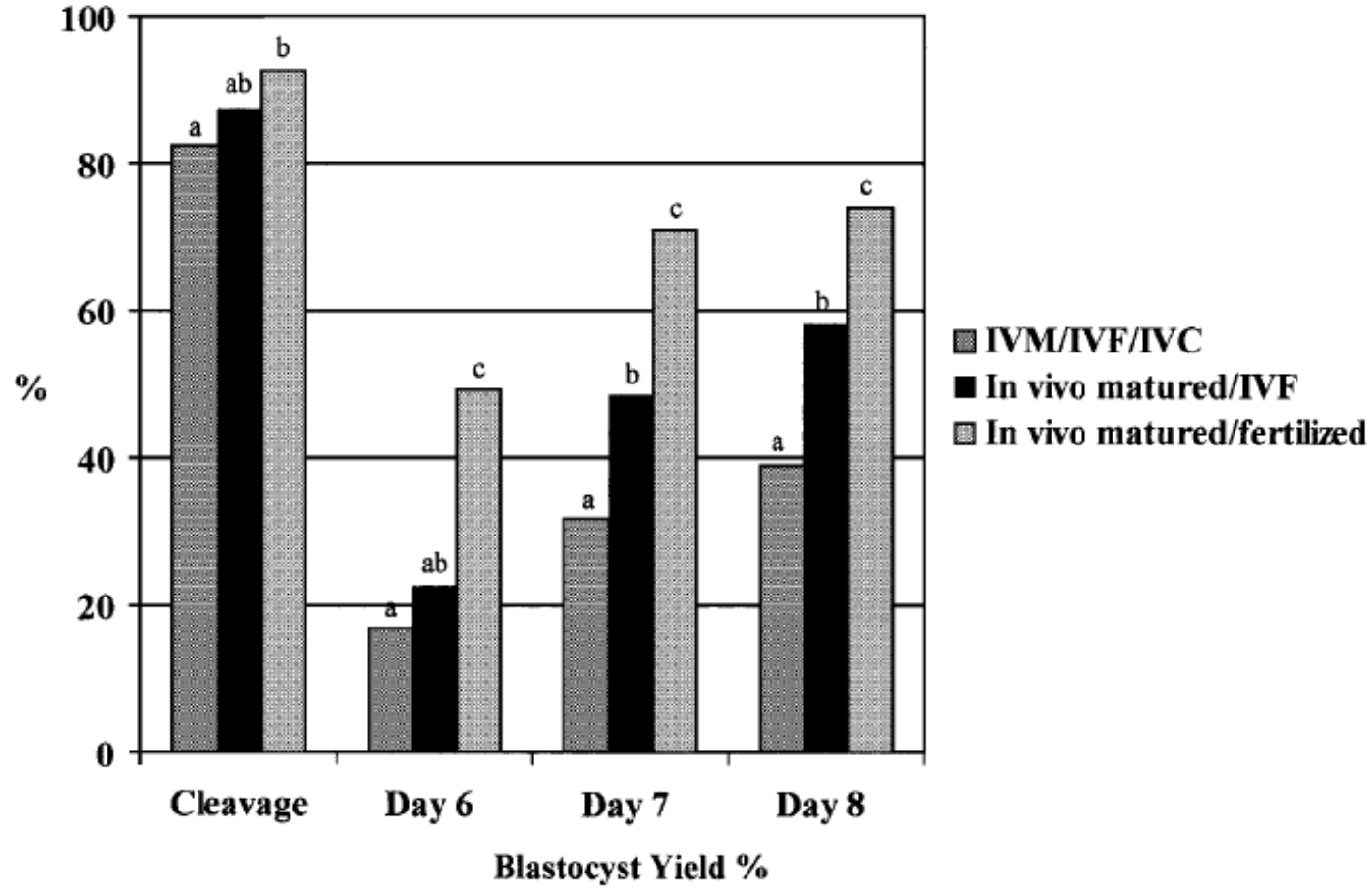


Fig. 4. Effect of fertilization in vivo or in vitro on the cleavage rate at 48 hr post insemination and the blastocyst yield on days 6, 7, and 8. In vivo matured bovine oocytes were either fertilized in vitro (n = 134) or in vivo by artificial insemination (n = 69). Both groups were

cultured in vitro in parallel with a control group of IVM/IVF/IVC oocytes (n = 388). Different superscripts indicate significant differences ( $P < 0.05$ ) between treatments.

---

**Table 81.3** Aberrant characteristics associated with the large offspring syndrome of IVP bovine pregnancies and calves.

---

Large calves

Increased gestation length

Decreased intensity of labor

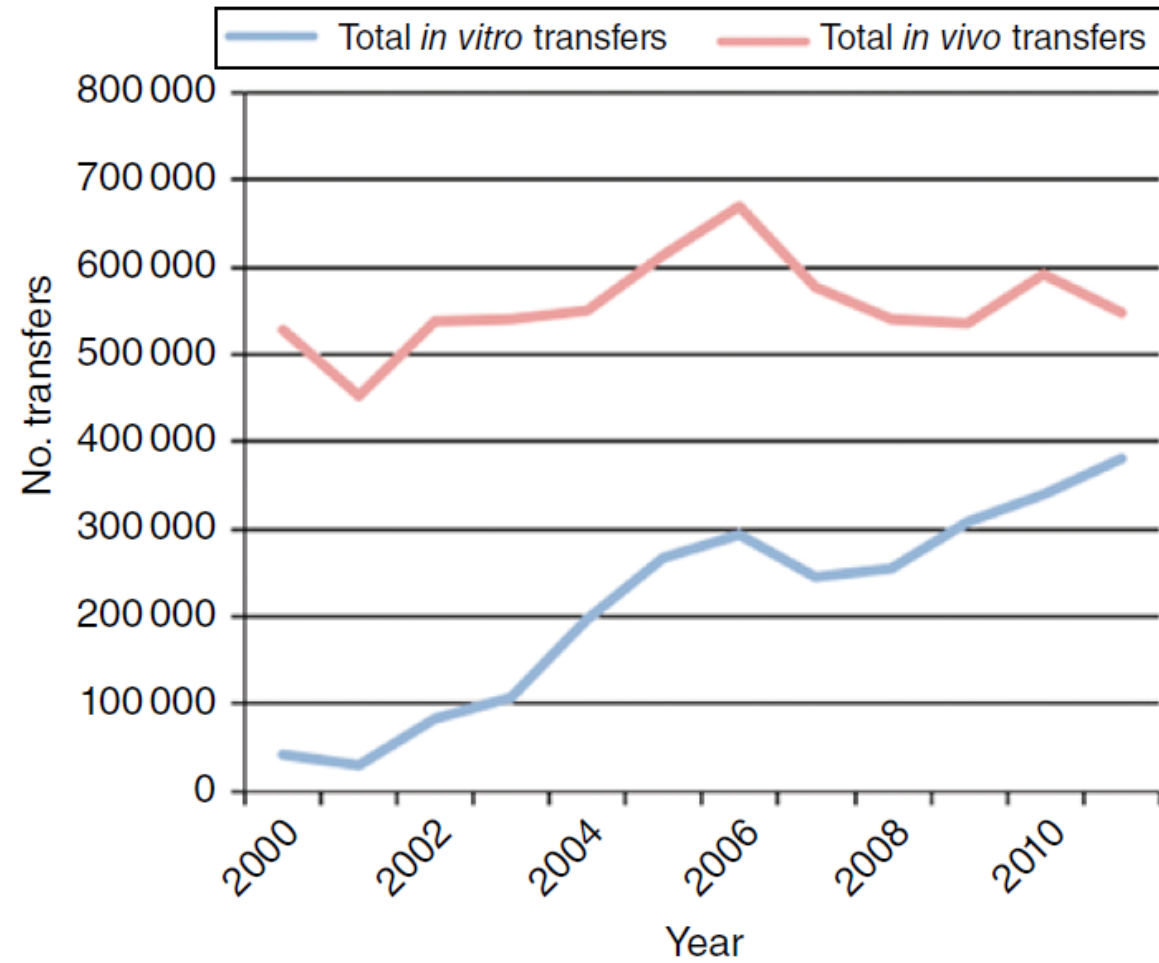
Increased rate of abortions

Increased rate of congenital malformations

Increased rate of perinatal mortality

Increased rate of hydroallantois in recipients

---



**Figure 81.4** Comparison of the annual number of *in vivo*-derived and IVP embryos transferred internationally since 2000. Compliments of the International Embryo Transfer Society.



Dziękuję za uwagę