

Klasyfikacja zarodków do ET

dr Ricardo Faundez

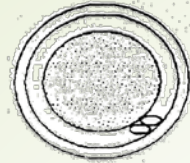
Zakład Rozrodu, Andrologii i Biotechnologii Rozrodu

Katedra Chorób Dużych Zwierząt z Kliniką

Wydział Medycyny Weterynaryjnej SGGW w Warszawie

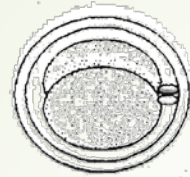
Days after oestrus

0-2



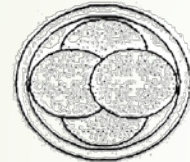
1 Cell

1-3



2 Cell

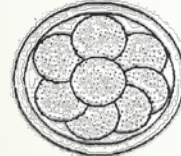
2-3



4 Cell

*

3-5



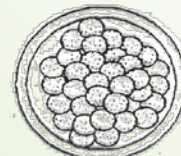
8 Cell

4-5



16 Cell

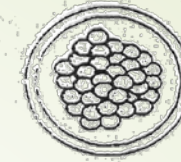
5-6



Morula

Days after oestrus

5-7



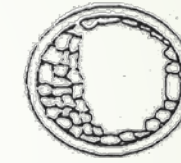
Tight morula

7-8



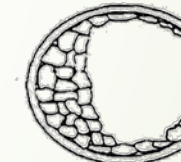
Early blastocyst

7-9



Blastocyst

8-10



Expanded blastocyst

9-11

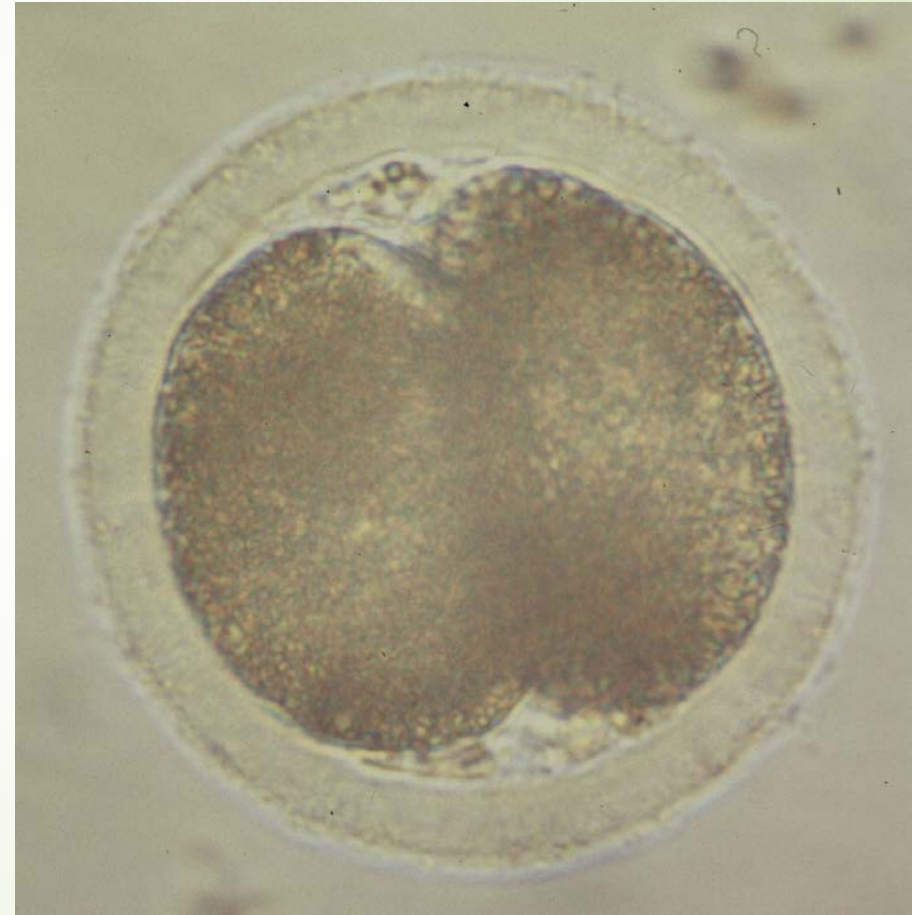
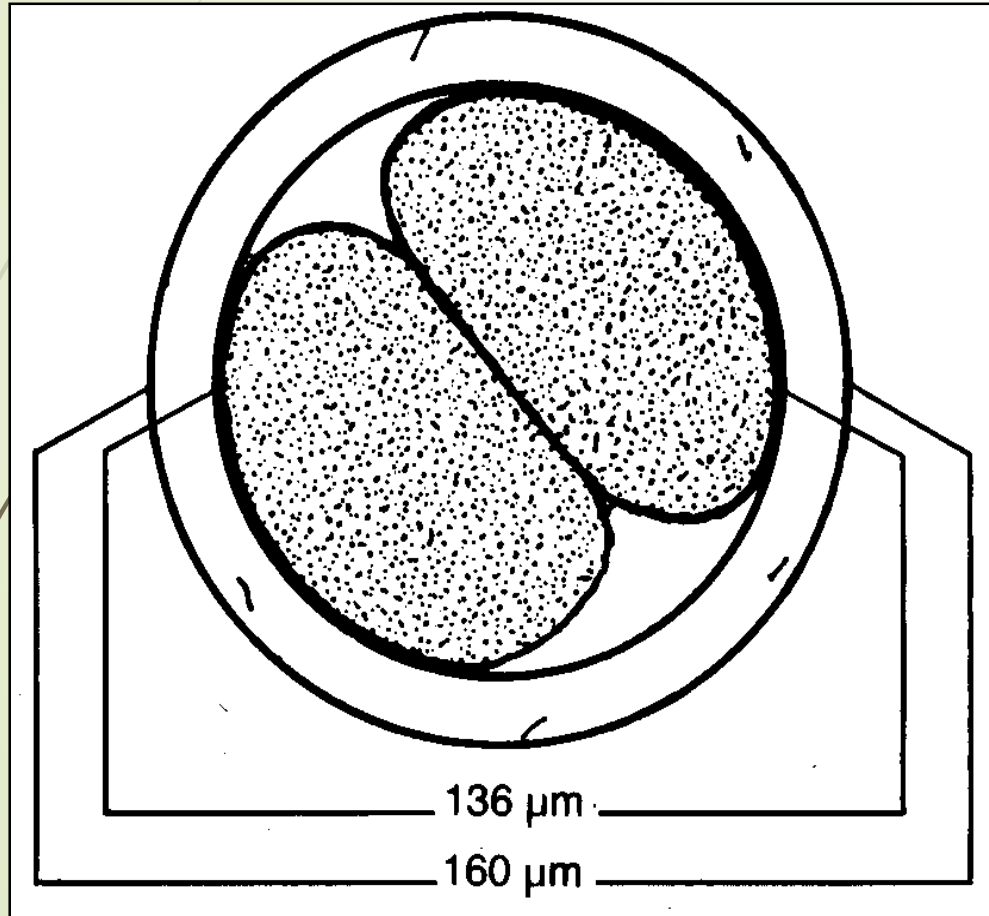


Hatching blastocyst

* Embryos usually move from the oviduct to the uterus at the 8- to 16-cell stage.

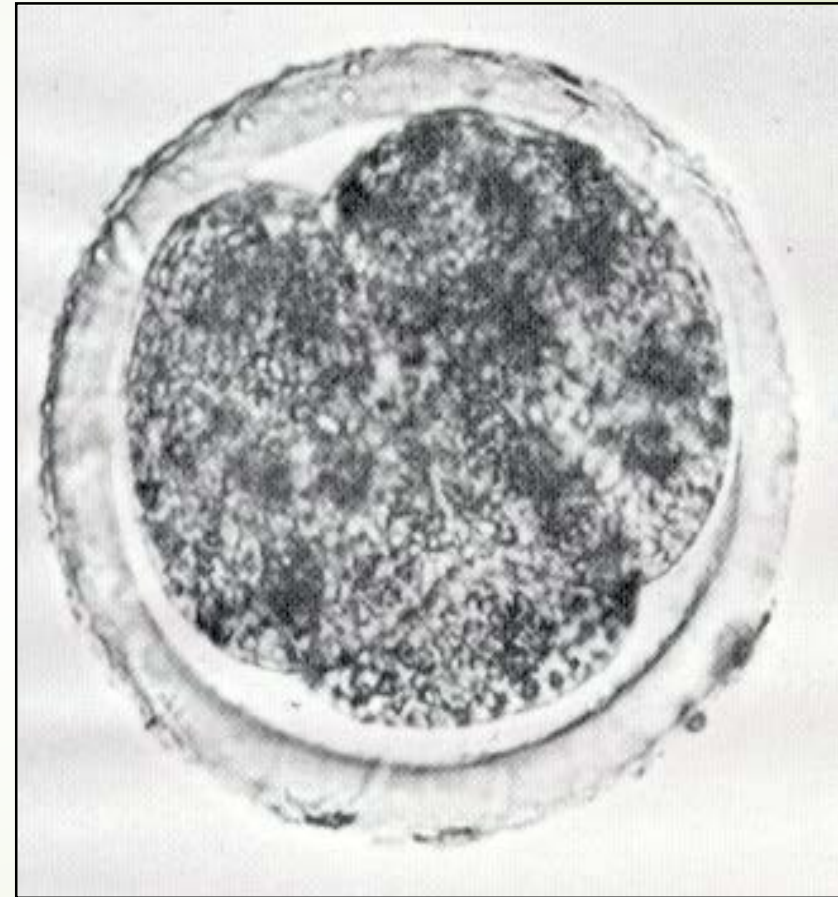
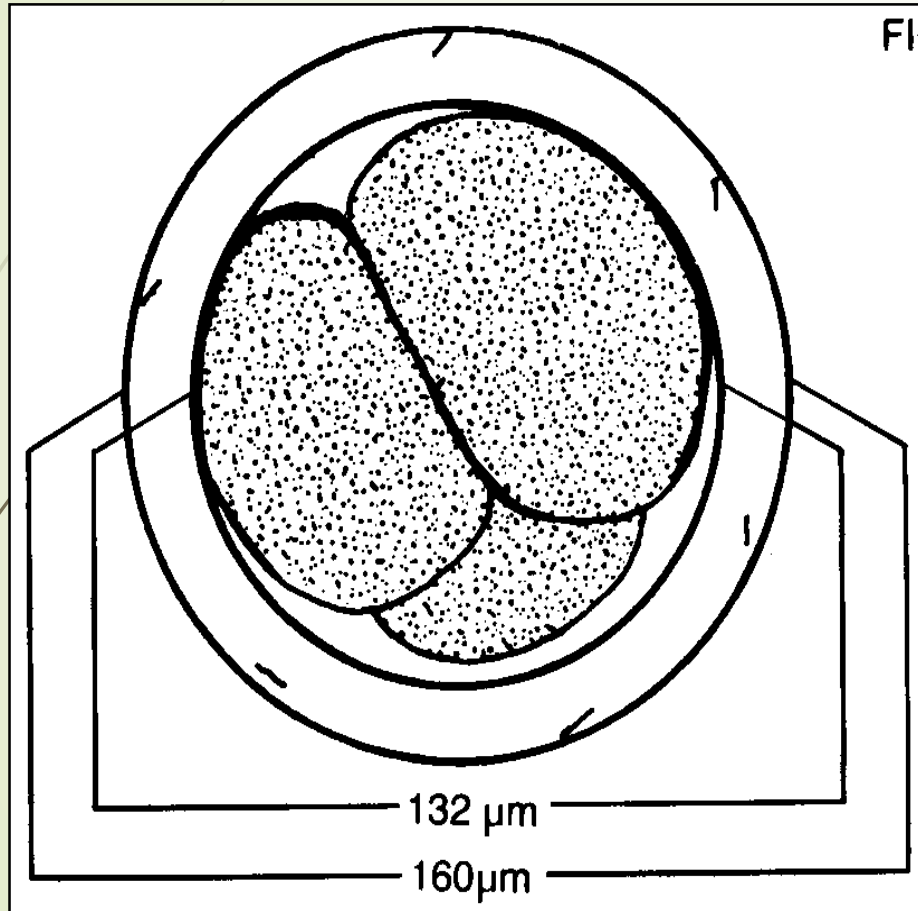
Embryon stade deux blastomères

J 2



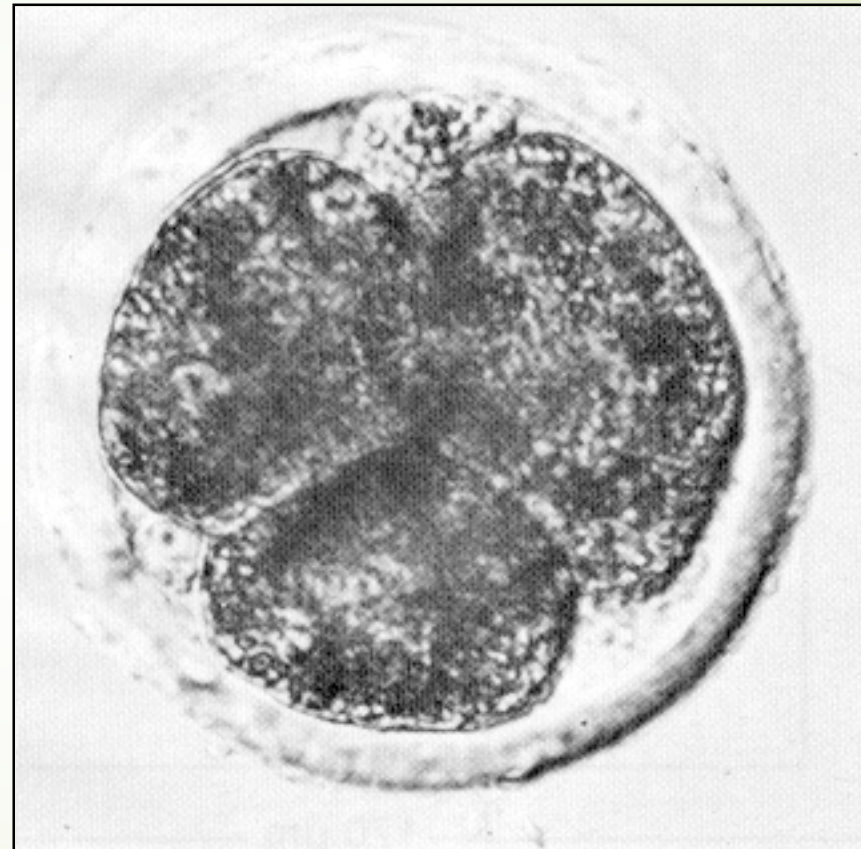
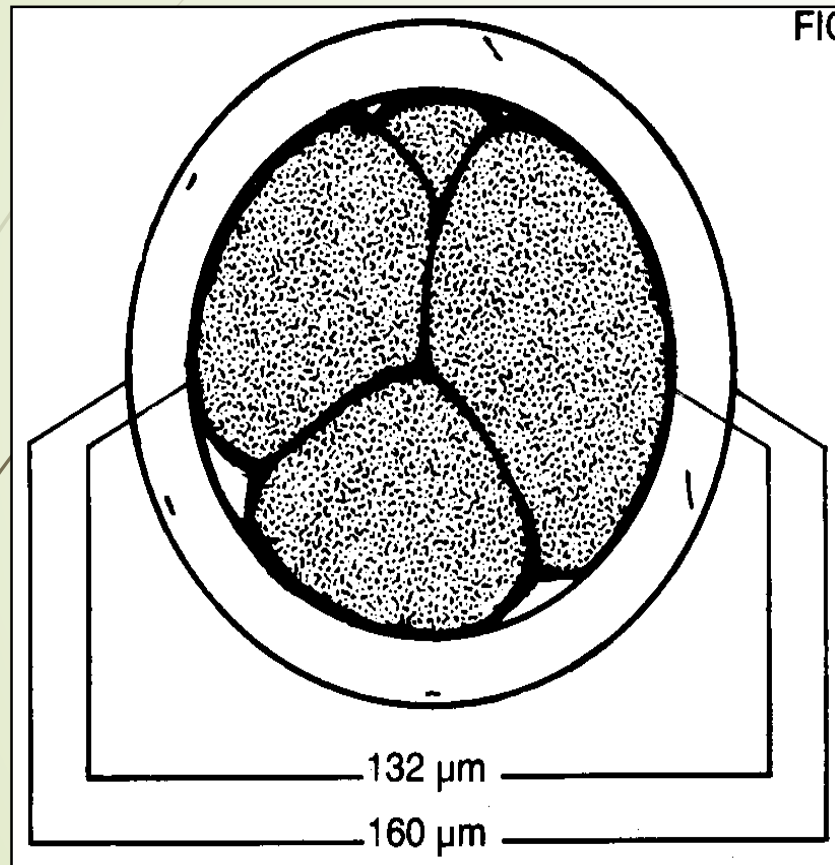
Embryon : stade deux blastomères
(manque de synchronisme dans les divisions, embryon à trois blastomères)

J2

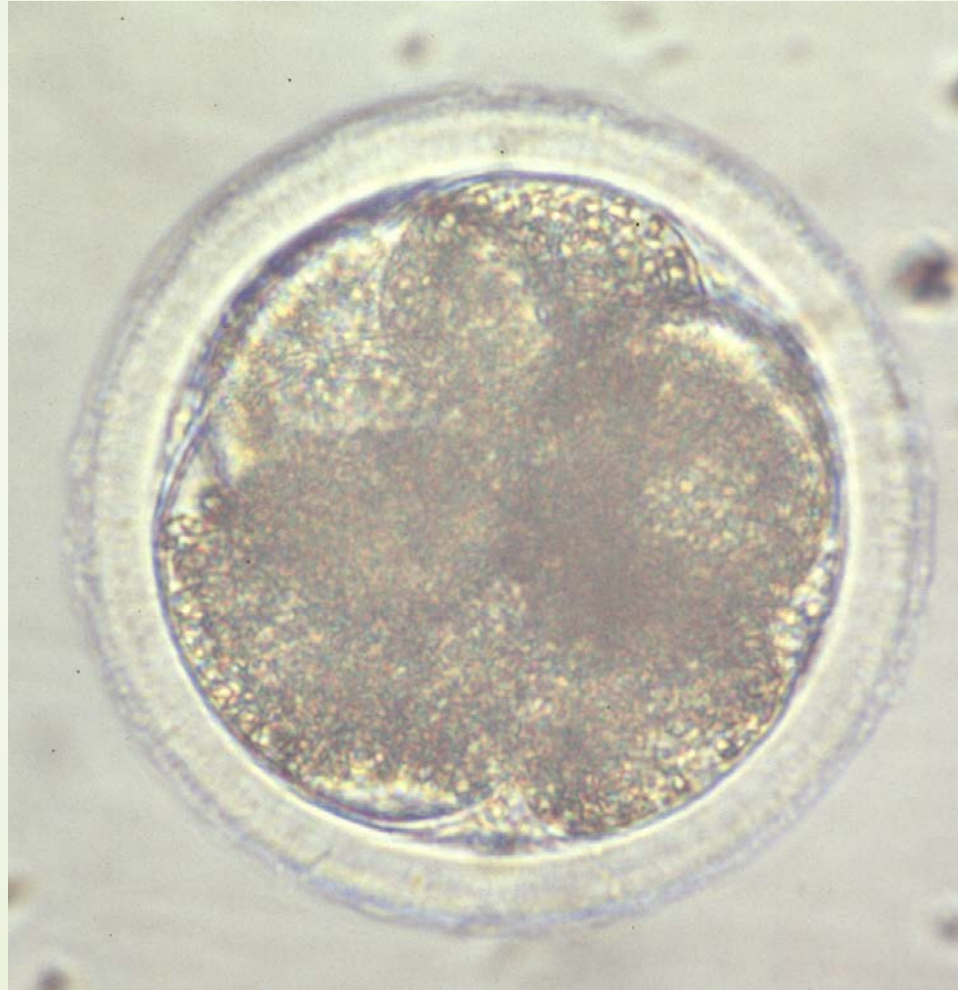


Embryon : stade quatre blastomères 2010

J2



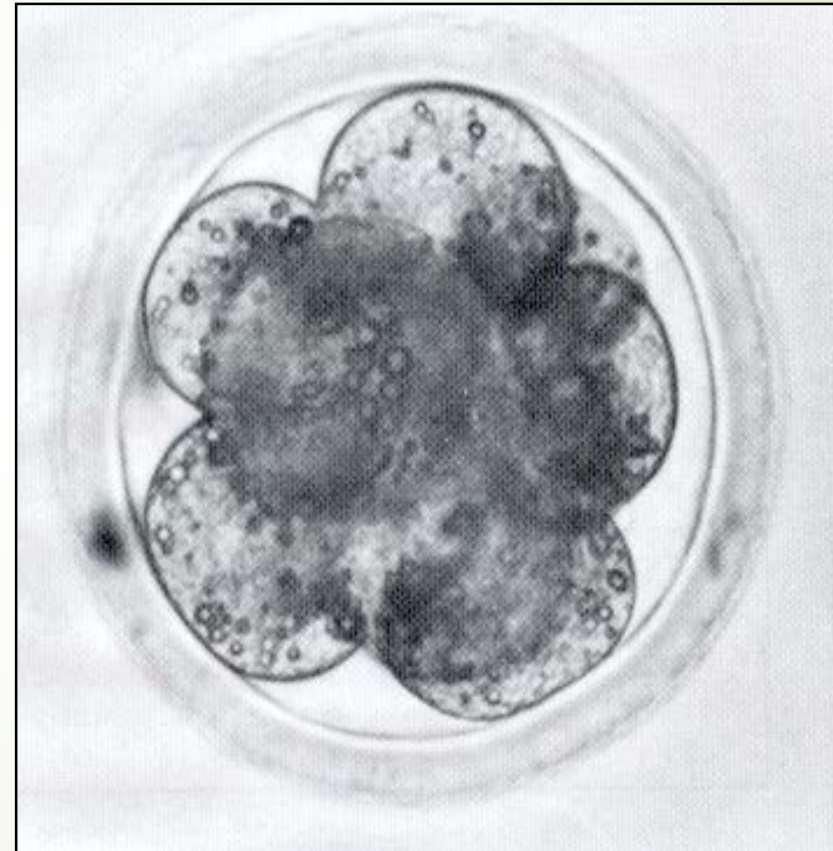
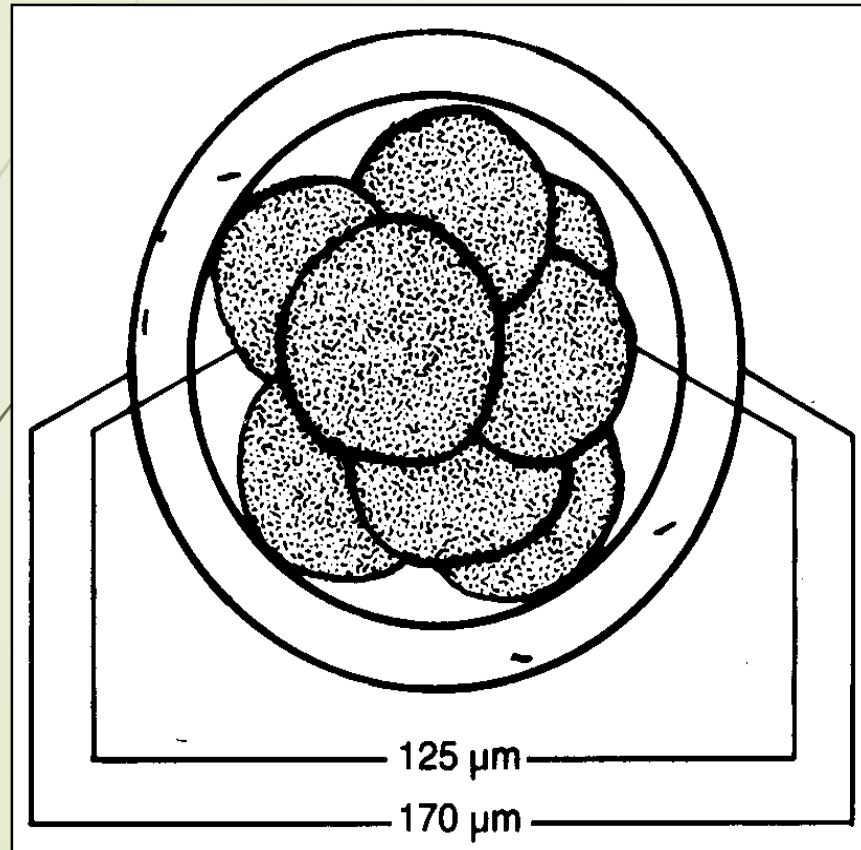
Embryon stade 6 blastomères 2515



2ème doc
2003-2004
Ch. Hanzen,
Ulg, FMV,
Production
d'embryons
in vivo

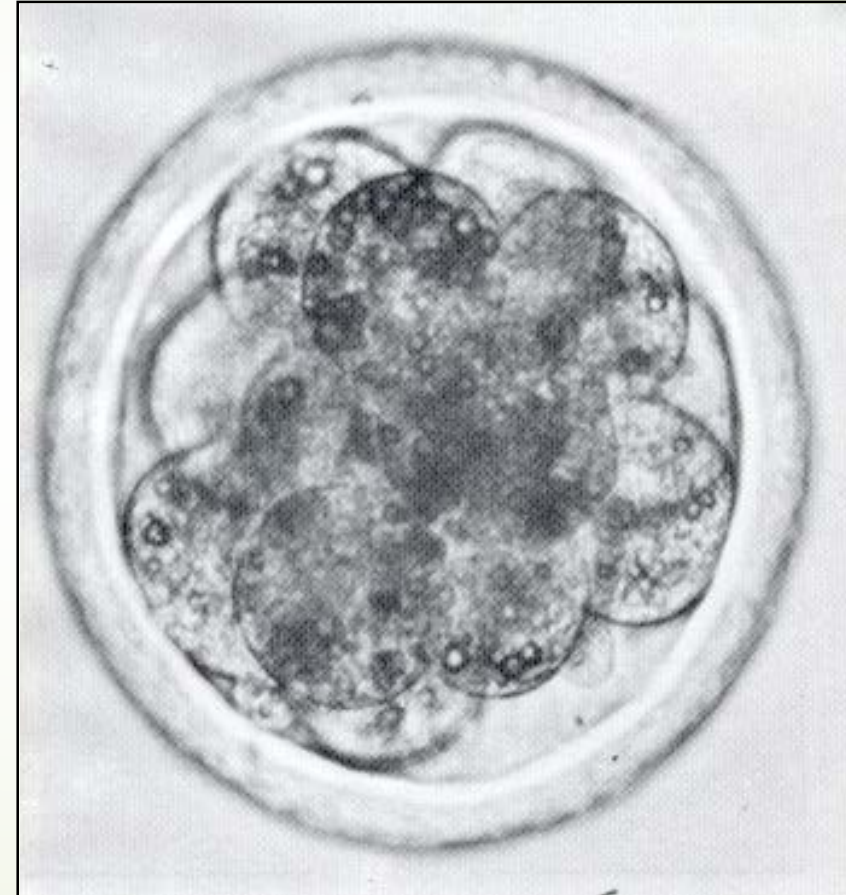
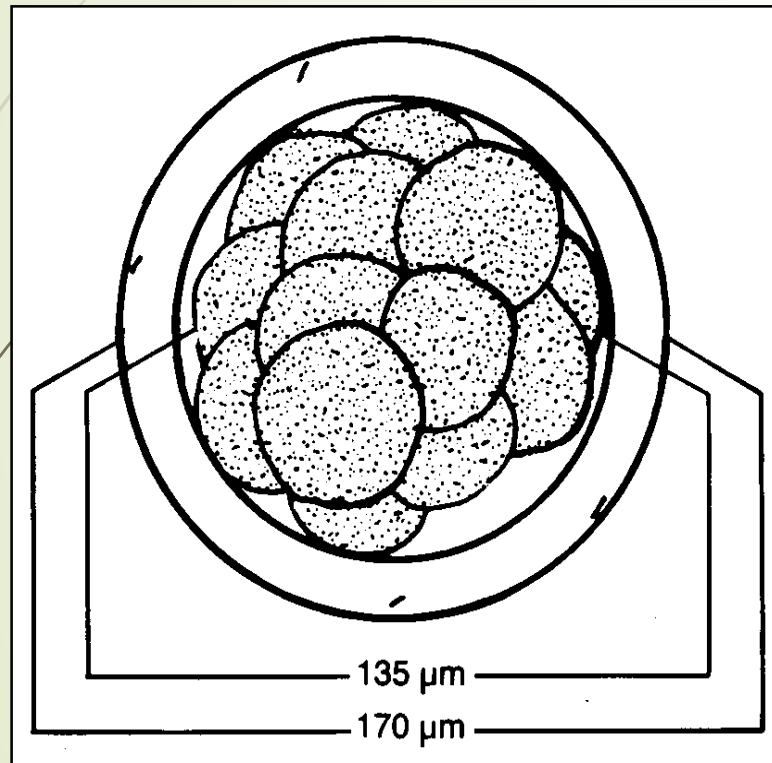
Embryon : stade huit blastomères

J 3



Embryon : stade seize blastomères

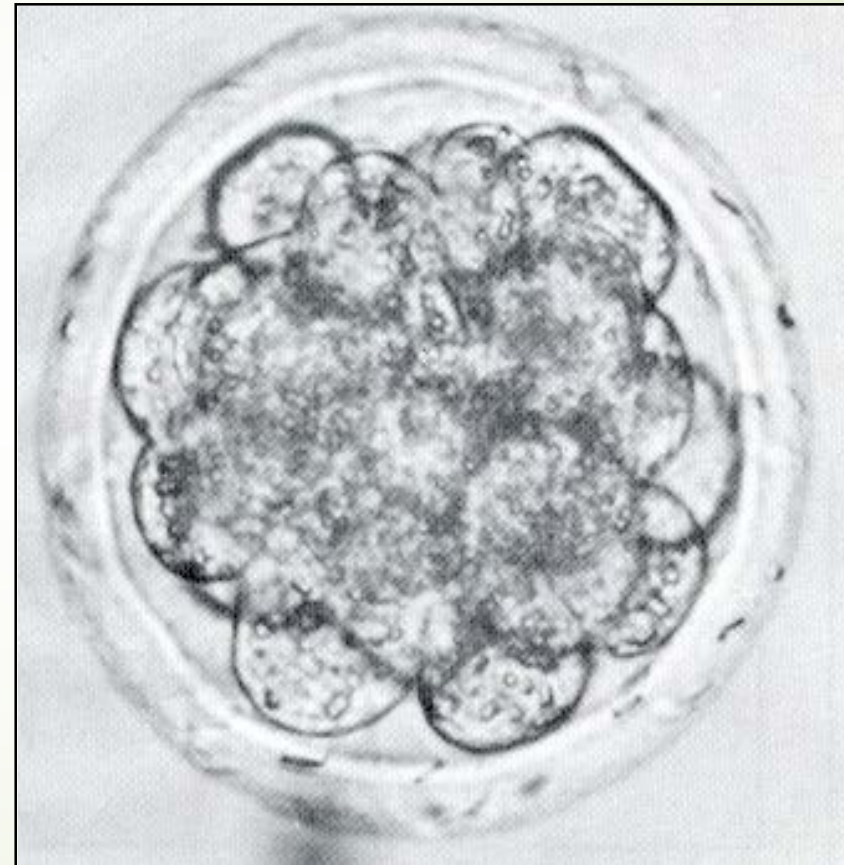
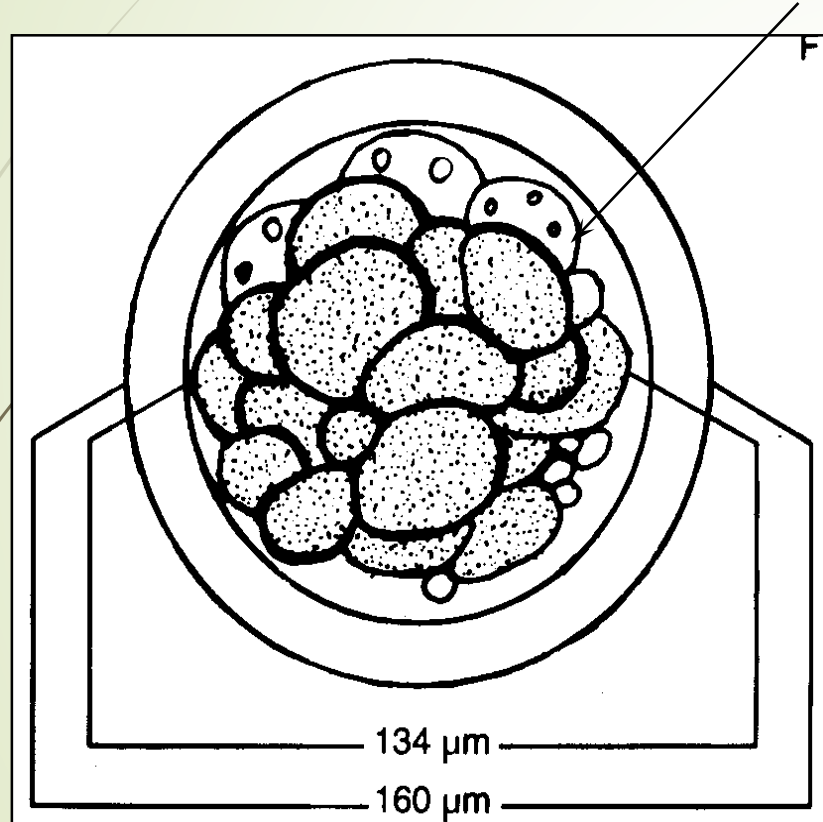
J 4



Embryon : stade 40 blastomères

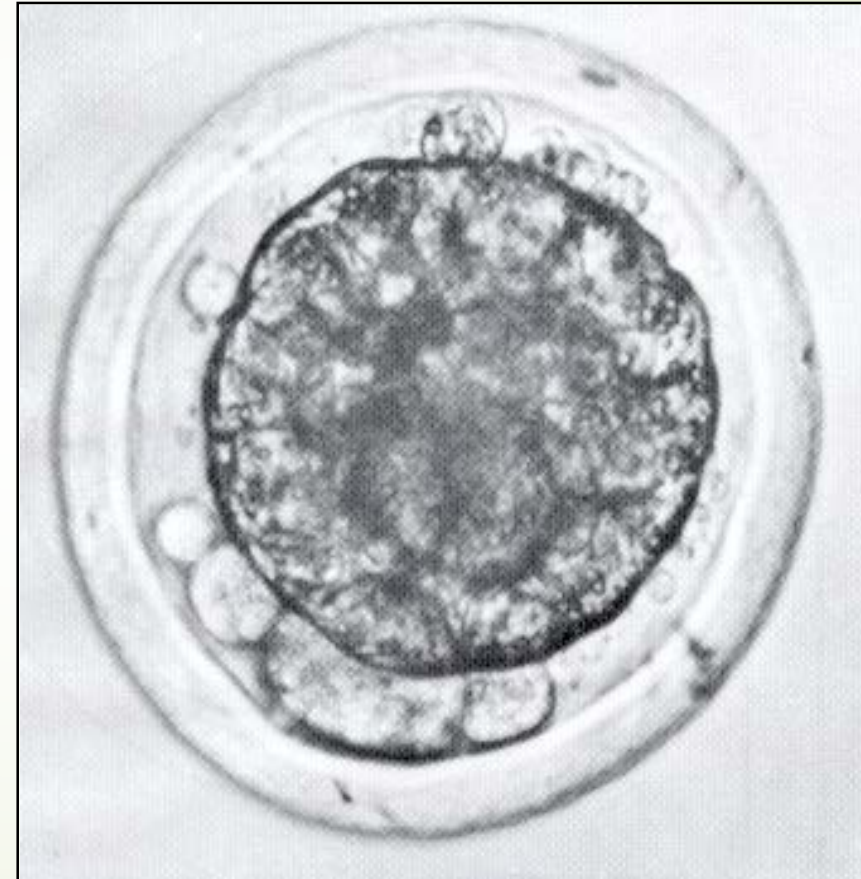
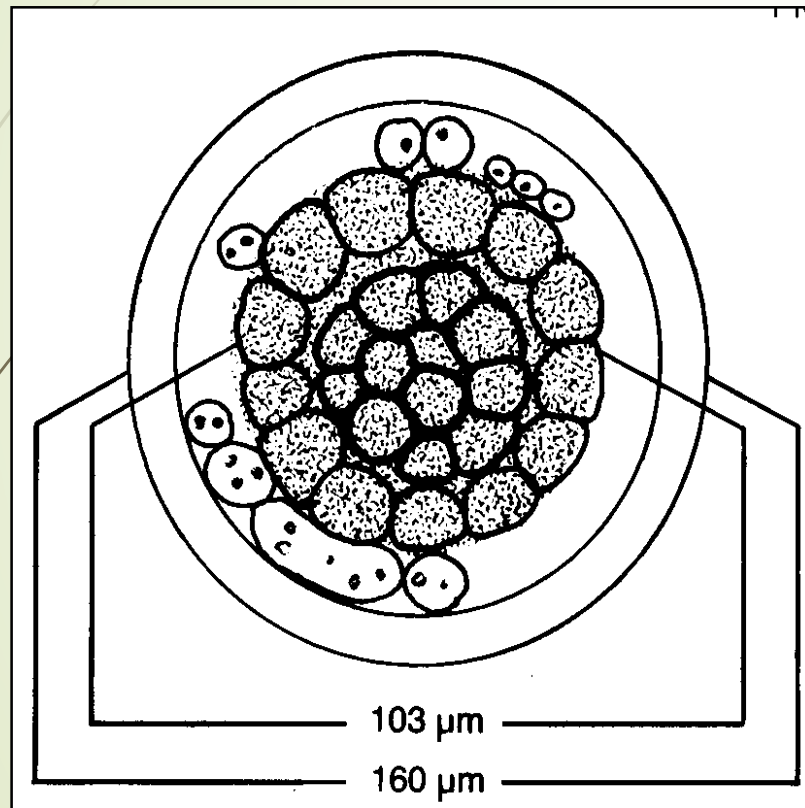
J5

Faux blastomère sans noyau



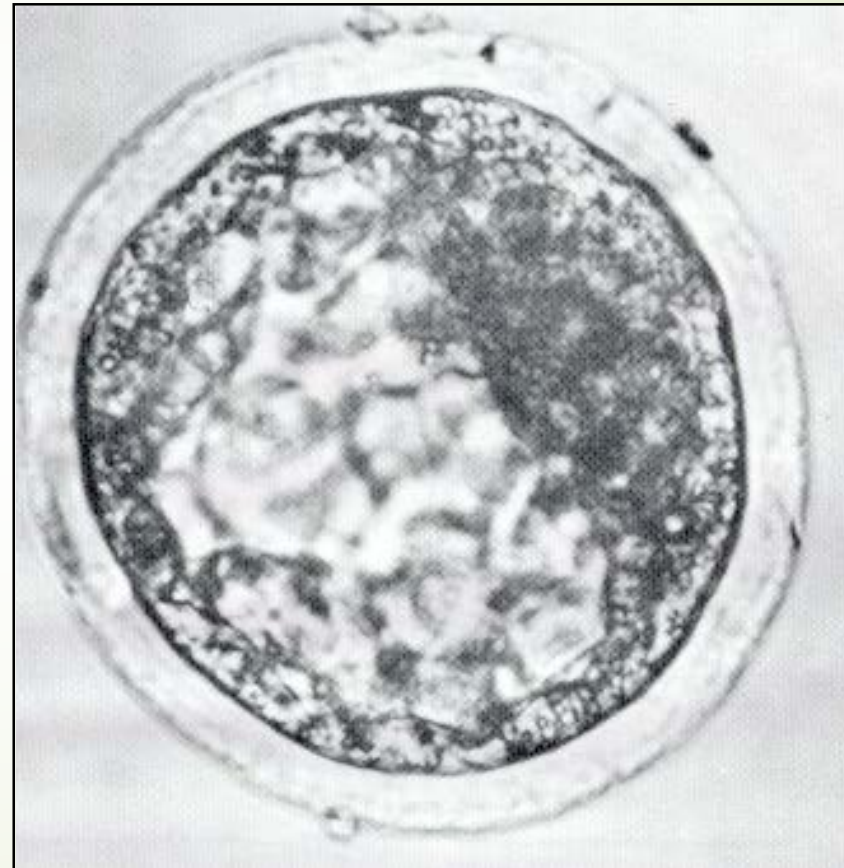
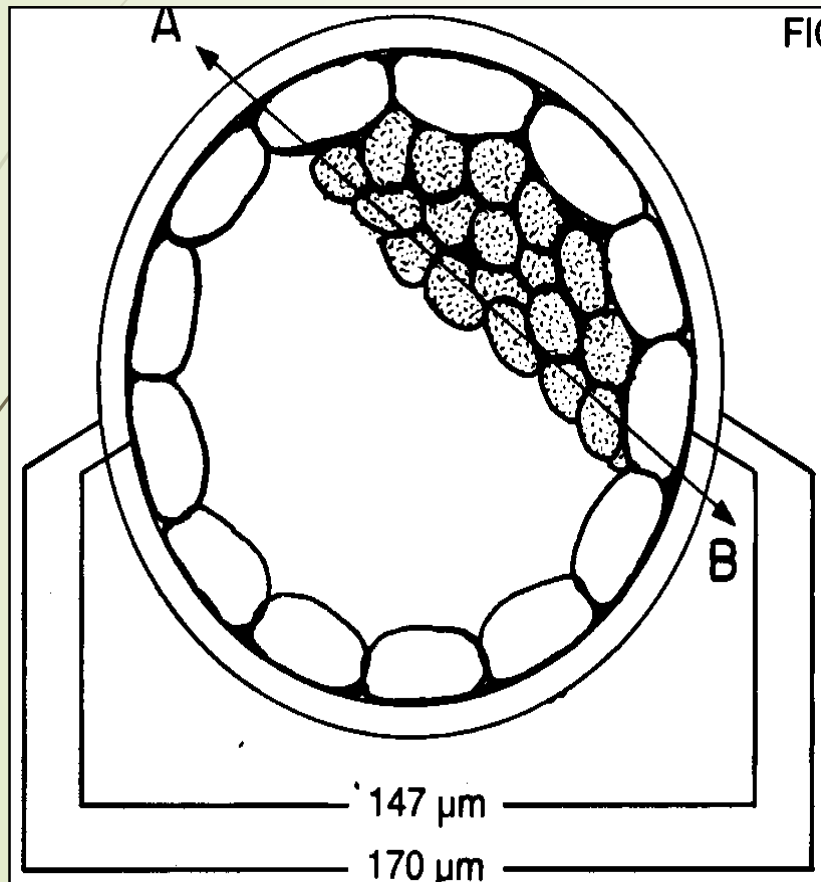
Embryon : stade 80 blastomères
Limites cellulaires moins distinctes

J 6



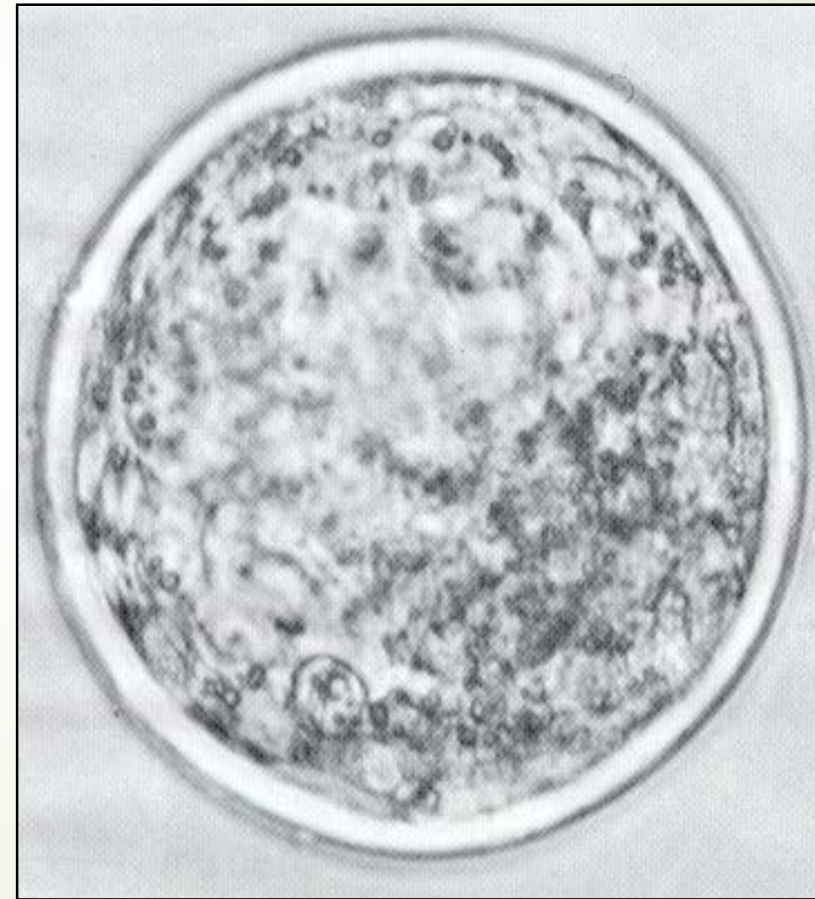
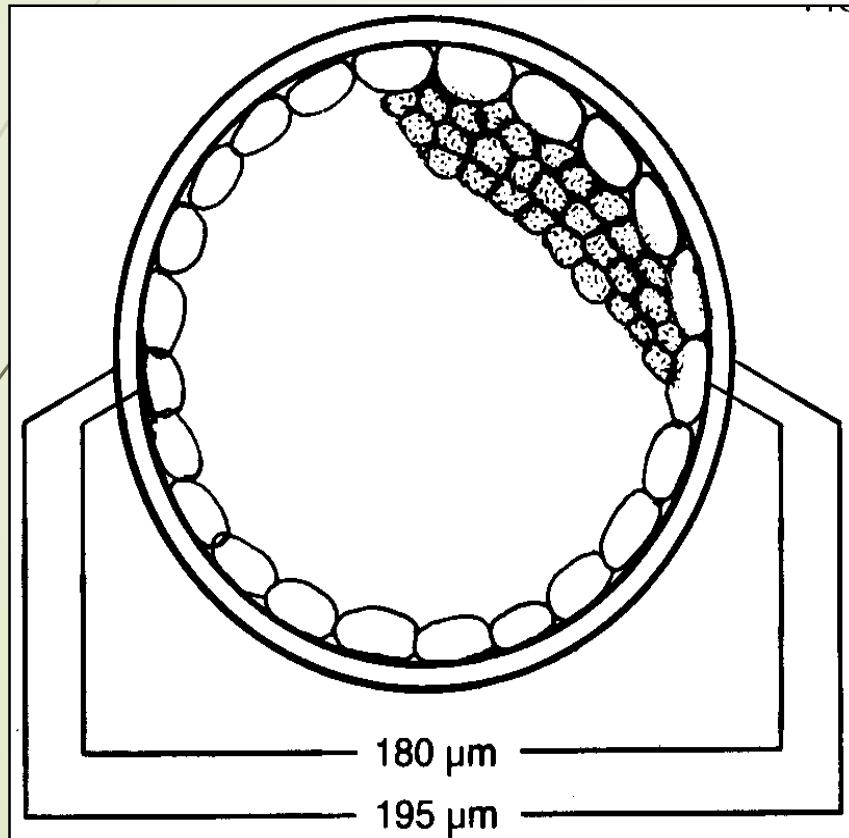
Embryon : stade jeune blastocyste
Formation du blastocoele
Amincissement de la pellucide

J 6



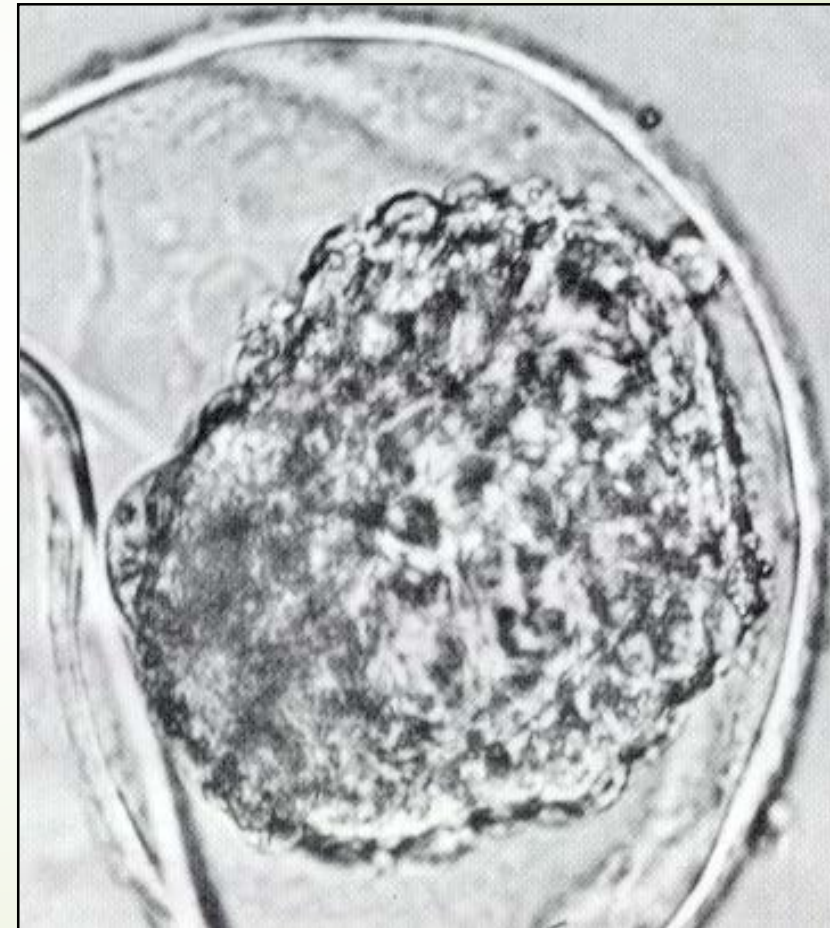
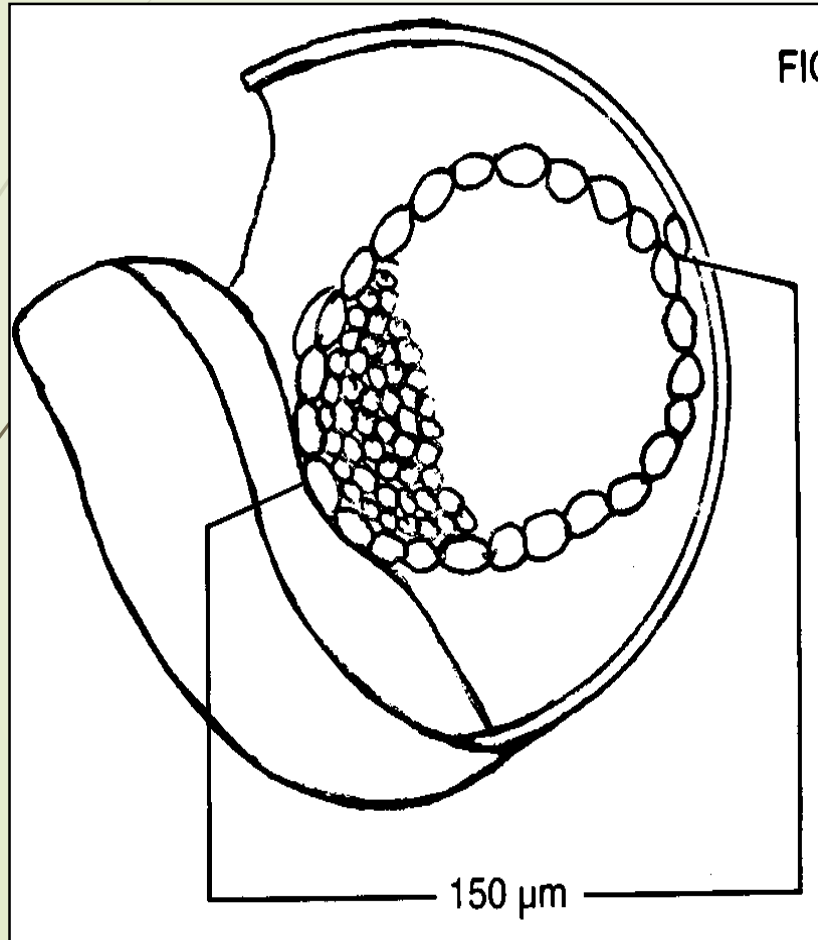
Embryon : stade blastocyste
Agrandissement du blastocoele
Poursuite de l'amincissement de la pellucide

J7



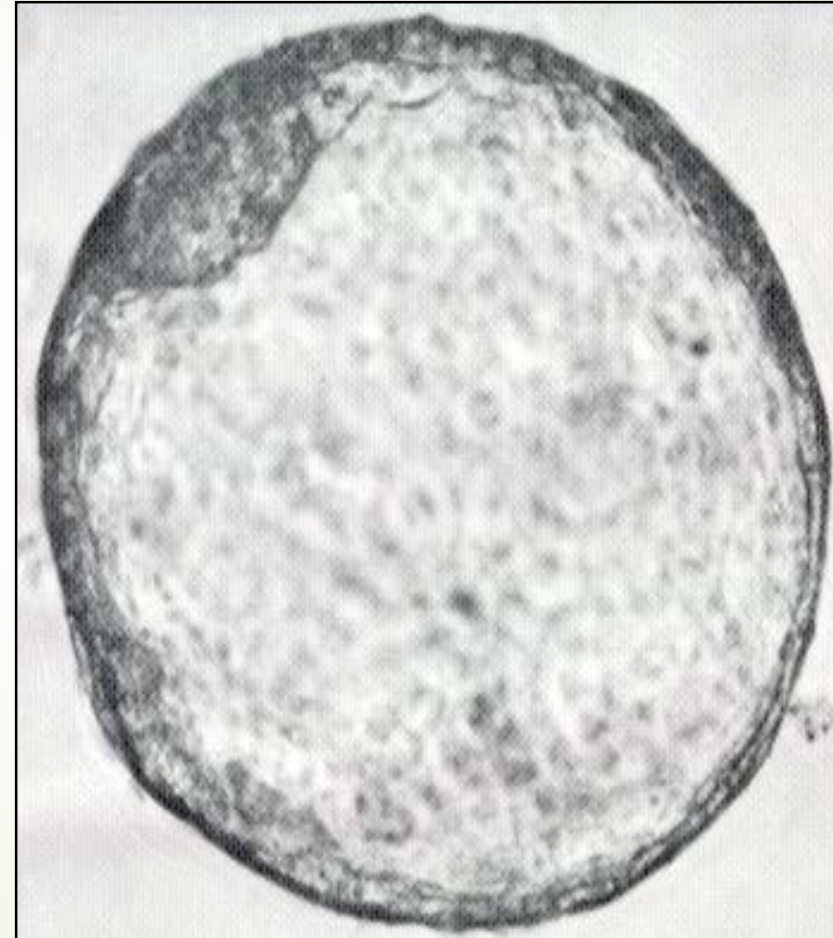
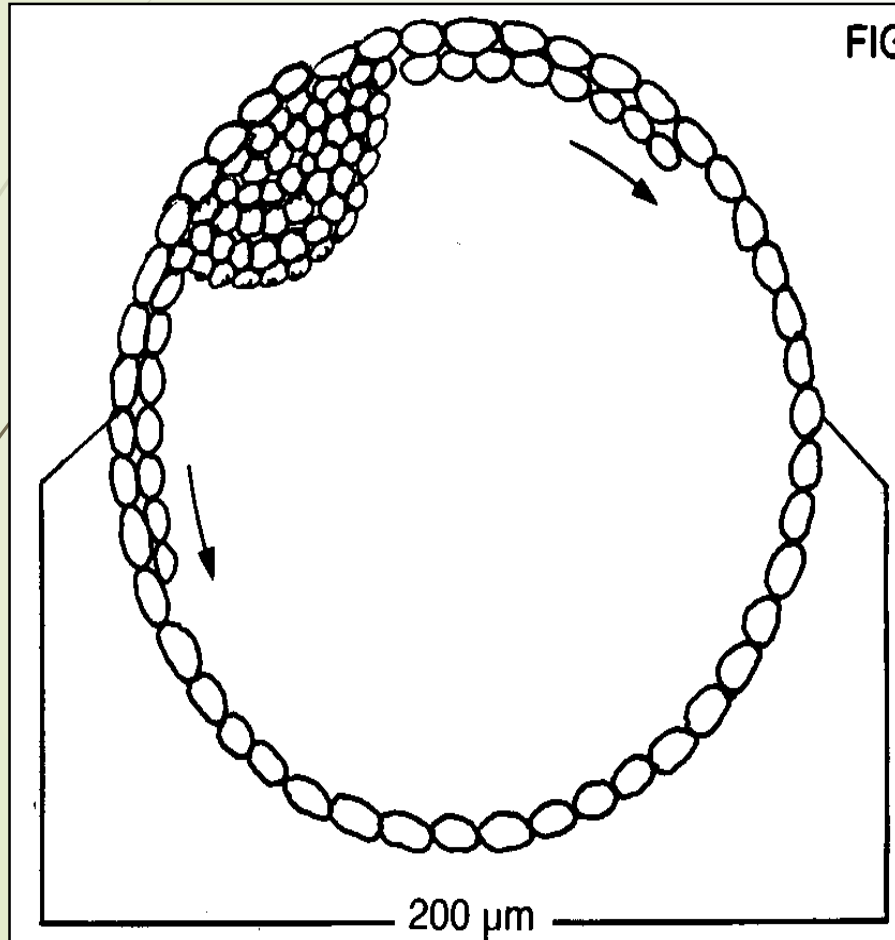
Embryon : stade blastocyste
Rupture de la pellucide (hatching)

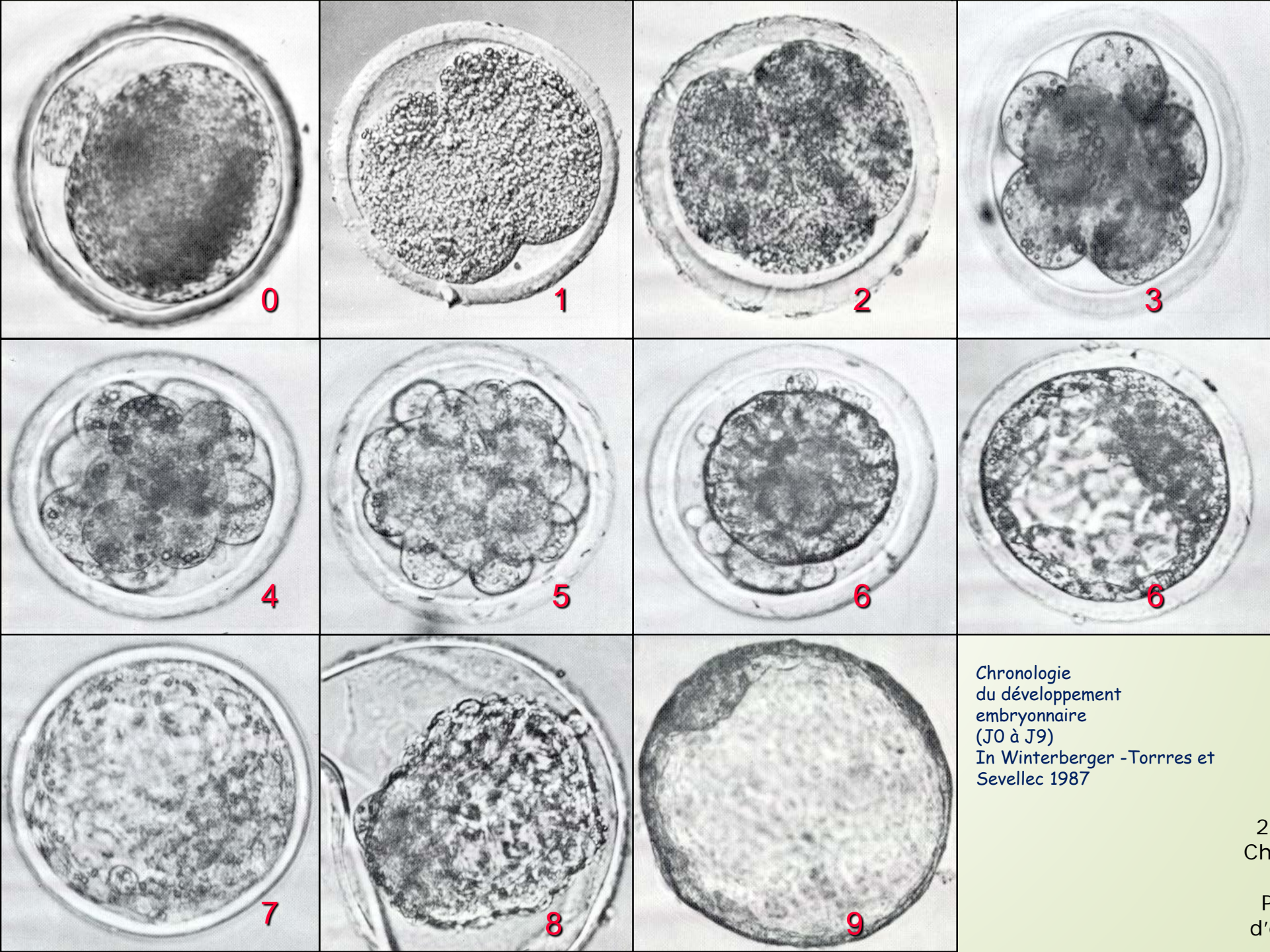
J 8



Embryon : blastocyste libéré de sa pellucide
Début de migration de l'endoderme

J 9





Chronologie
du développement
embryonnaire
(J0 à J9)
In Winterberger -Torres et
Sevellec 1987

2ème doc
2003-2004
Ch. Hanzen,
Ulg, FMV,
Production
d'embryons
in vivo

Ocena zarodków

➤ Kryteria morfologiczne

- Zewnętrzna średnica
- Grubość osłonki przejrzystej
- Liczba komórek
- Sposób wykluwanie się zarodka

➤ Kryteria metaboliczne

- Test enzymatyczny (test FDA) : Dwuoctan fluoresceiny pod wpływem esteraz obecnych w żywych komórkach fluoryzuje.
- Określenie zużycia glukozy
- Określenie syntezy dehydrogenazy mleczanowej

Morfologiczne kryteria używane w ocenie rozwoju embrionalnego u bydła (Lonergan, 1992).

- **Kompaktowa morula** - Indywidualne blastomery łączą się, kształtując gęstą masę. Masa zarodka zajmuje 60-70% przestrzeni okołozótkowej .
- **Wczesna blastocysta** - Zarodek , który stworzy napełnioną płynem jamę albo blastocel, mający ogólny wygląd sygnetu. Zarodek zajmuje 70-80% przestrzeni okołozótkowej . Wzrokowe rozróżnianie trofoblastu od wewnętrznej masy komórek może być możliwe w tym stadium rozwoju.
- **Blastocysta albo średnia blastocysta** - Wyraźne zróżnicowanie zewnętrznej warstwy trofoblastu oraz ewidentnie ciemniejsza i bardziej gęsta wewnętrzna masa komórek. Blastocel jest w bardzo widoczny zajmujący największą część przestrzeni okołozótkowej..
- **Rozszerzona blastocysta** - Wielkość średnicy zarodka dramatycznie wzrasta (1.2 do 1.5 razy), jednocześnie jego osłonka przejrzysta staje się cieńsza od oryginalnej grubości.
- **Wylęganie się blastocysty** -Zarodki mogą przechodzić proces wylęgania, lub zupełnie pozbywają się osłonki przejrzystej.
- **Wylęgana rozszerzona blastocysta** - ponownie rozszerzany zarodek z wielkim blastocelem, o okrągłym kształcie, bardzo delikatny wygląd, w późniejszych stadiach o wydłużonym kształcie.

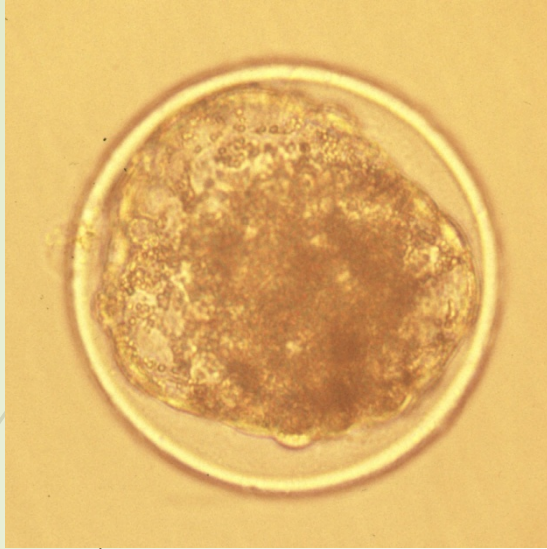


Ocena morfologiczna zarodków wg

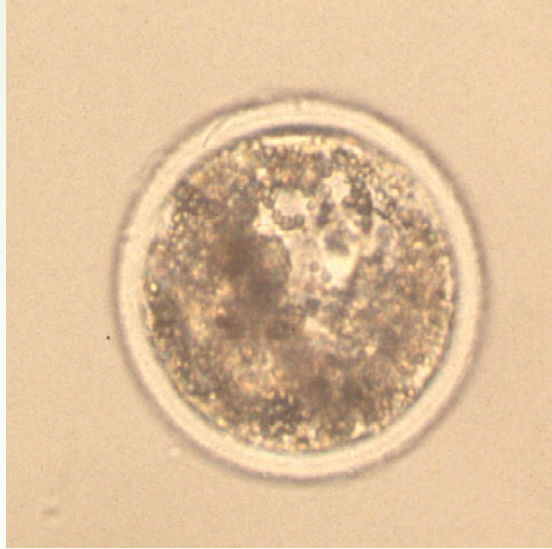
Eldsen'a 1978

- Ostonka przejrzysta
 - Okrągłość
 - Grubość
 - Obecność pęknięć
- Blastocysta
 - Prawidłowość ogólnego wyglądu
 - Możliwość identyfikacji trofoblastu, wężła zarodkowego i jamy blastocysty
- Komórki blastocysty
 - Wygląd kontur, wielkość
 - Obecność luźnych komórek w przestrzeni około żółtkowej
 - Obecność wakuol wewnątrzkomórkowych

Morula

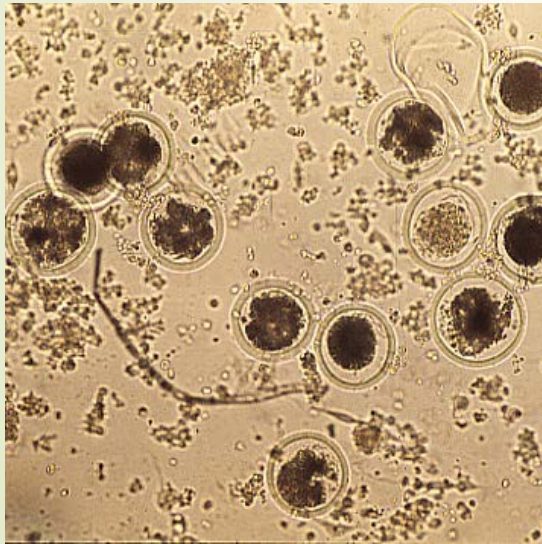


Wczesna blastocysta

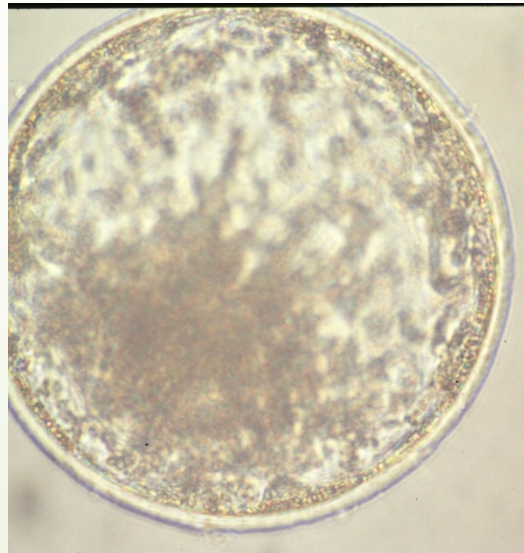


Blastocysty

Zdegenerowane blastocysty



Ekspandująca blastocysta



Wykluwająca blastocysta





Ocena zarodków

Podwójna ocena

- Ocena bezwzględnego rozwoju: zarodek wykazuje prawidłowy wygląd dla danego stanu rozwoju - morula, wczesna blastocysta, blastocysta
- Ocena względnego rozwoju: Stadium rozwoju zarodka odpowiada oczekiwanego stanu rozwoju dla danego dnia ciąży

Ocena zarodków na podstawie budowy morfologicznej wg IETS

| Jakość | Cechy charakterystyczne |
|------------------------------|--|
| Stopień I bardzo dobry | zarodek idealnie kulisty, symetryczny z komórkami jednakowej wielkości, koloru i konsystencji |
| Stopień II dobry | nikłe nieprawidłowości, takie jak oddzielenie jednego blastomeru, nieregularny kształt, pęcherzykowaty twór w blastomerze |
| Stopień III dostateczny | bardziej nasilone nieprawidłowości, kilka komórek lub blastomerów w przestrzeni okołootoczkowej, pęcherzykowate twory lub zdegenerowane komórki, ziarnistości w cytoplaźmie |
| Stopień IV niedostateczny | luźne blastomery, zdegenerowane komórki, popękane błony komórkowe, komórki różnych wielkości, zmiany w zabarwieniu, uszkodzenia otoczki przejrzystej przy równoczesnym zachowaniu części komórek o prawidłowym wyglądzie |
| Stopień V zarodek martwy | masa komórkowa całkowicie zdegenerowana |

Wpływ wieku i jakości zarodka na liczbę blastomerów (Wurth i wsp., 1988)

| Klasyfikacja | Wiek zarodka w dniach | | |
|---------------------|-----------------------|-----------|-----------|
| | 5 | 6 | 7 |
| Jakość zarodka | | | |
| bardzo dobra (I) | — | 59.5 ±8.2 | 80.8 ±6.1 |
| dobra (II) | 35.2 ±1.7 | 60.6 ±3.2 | 77.1 ±4.3 |
| dostateczna (III) | 26.6 ±4.9 | 44.7 ±2.7 | 67.5 ±4.8 |
| niedostateczna (IV) | 23.3 ±3.0 | 27.2 ±2.7 | 30.8 ±4.6 |

Wpływ jakości zarodków na odsetek ciąży po transferze (zarodki świeże)

Tabla 1. Efecto de la calidad embrionaria sobre el porcentaje de preñez pos transferencia de embriones sin criopreservar.

| Autores | Calidad embrionaria | Embriones transferidos n | Receptoras preñadas | |
|---------------------------|---------------------|-----------------------------|---------------------|-------------------|
| | | | n | % |
| Wright (116) | buena | 1748 | 1122 | 64,2 ^a |
| | regular | 438 | 198 | 45,2 ^b |
| | pobre | 100 | 33 | 33,0 ^c |
| Hasler y col. (36) | buena | 5521 | 4037 | 73,1 ^a |
| | regular | 304 | 181 | 59,5 ^b |
| | pobre | 76 | 31 | 40,8 ^c |
| Reinchenbach y col. (91)* | excelente y buena | 61 | 33 | 54,1 ^a |
| | regular | 41 | 21 | 51,2 |
| | pobre | 27 | 7 | 25,9 ^b |
| Hasler y col. (37)* | excelente y buena | 1802 | 1035 | 57,4 ^a |
| | regular | 441 | 184 | 41,7 ^b |

a, b, c diferencias significativas ($p < 0,05$)

* Embriones producidos *in vitro*

Wpływ jakości zarodków przed zamrożeniem na odsetek ciąży po transferze

Tabla 2. Efecto de la calidad embrionaria pre-congelación sobre el porcentaje de preñez pos transferencia.

| Autores | Calidad embrionaria pre-congelación | Embriones transferidos n | Receptoras preñadas | |
|-----------------------|-------------------------------------|-----------------------------|---------------------|-------------------|
| | | | n | % |
| Leibo (50) | excelente | 173 | 84 | 48,6 ^a |
| | buena | 220 | 98 | 44,6 ^a |
| | regular | 83 | 20 | 24,1 ^b |
| Arreseigor y col. (6) | excelente | 233 | 133 | 57,1 ^a |
| | buena | 276 | 146 | 52,9 ^a |
| | regular | 276 | 86 | 31,2 ^b |
| Munar y col. (70) | excelente | 1633 | 996 | 60,9 ^a |
| | buena | 565 | 301 | 53,3 ^b |
| | regular | 123 | 49 | 39,8 ^c |

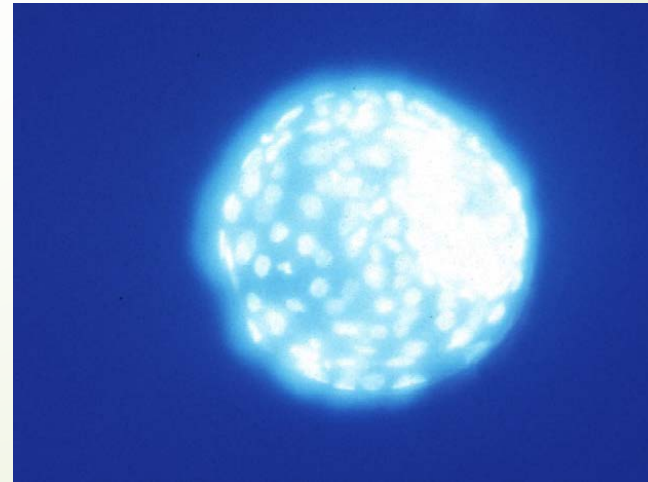
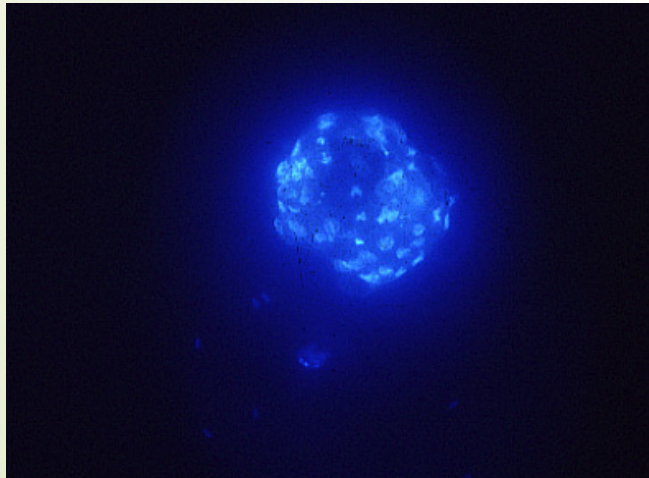
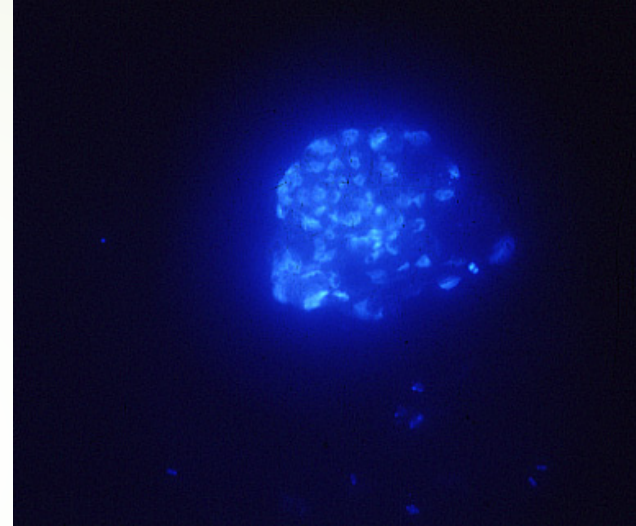
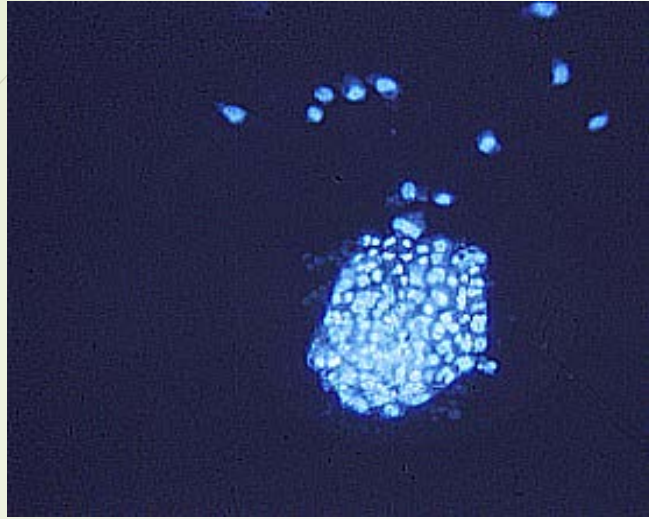
a, b, c diferencias significativas ($p < 0,05$)



Ocena przydatności zarodków na podstawie testów laboratoryjnych

- ▶ Test fluorescencyjny FDA
- ▶ Test fluorescencyjny DAPI
- ▶ Barwienie barwnikiem Hoechst 33342
- ▶ Testy oceniające metabolizm zarodków
 - ▶ Zużycie glukozy
 - ▶ Aktywność LDH
 - ▶ Zużycie tlenu

Test FDA



Example 1



International Embryo Transfer Society

Revised January 1986

A. CERTIFICATE OF EMBRYO RECOVERY

Form A: Certificate of Embryo Recovery. Fields include Breed, Donor Name, Owner, Service Sire, E.D. Code, Freeze Date or Batch No., Signature, Ear Tag or Tattoo, Onset Estrus Date, Breeding Date, Recovery Date, No. Recovered, No. Transferred, No. Frozen.

B. CERTIFICATE OF EMBRYO TRANSFER

Form B: Certificate of Embryo Transfer. Includes Recipient Identification, Date of Embryo Transfer, and a table for Recipient Information with columns for Ear Tag No., Sire, Breed Code, Date, Page Code, Quality Code, Embryo Divided, and Comment.

C. CERTIFICATE OF FREEZING

Form C: Certificate of Freezing. Fields include Type of Container, Case No., Sire or Amp. No., No. Embryos, No. if Plucked, Code Page, Code Quality, Zone Intact, Divided, Time from recovery to onset of freezing, How Frozen, Seed Temp., Cooling Rate, Plunge Temp., Recommended method of thawing, and Signature.