Микроманипулационни техники

проф. Пламен Тодоров, дбн

Институт по биология и имунология на размножаването - БАН

fppt.com

План на презентацията

- Условия (необходима апаратура, среди и консумативи)
- Типове и видове микроманипулатори
- ICSI (оплождане чрез инжектиране на сперматозоид в ооплазмата)
- PGD/PGS (Биопсия на полярни телца, бластомери и клетки от трофектодермата)
- Assisted zona hatching (подпомагане на „излюпването“ на ембриона)
- Отделяне на фрагменти от предимплантационни ембриони
- Отделяне на пронуклеуси (енуклеация)
- Нуклеарен трансфер (клониране)
- Хибридни ембриони
- Трансфер на цитоплазма
- Замразяване на единични сперматозоиди в ZP
- Получаване на ембрионални стволови клетки
- Инжектиране на криопротектори с висока молекулна маса
- Редактиране на генома (CRISP/Cas9)

fppt.com

Необходимост от използване на микроманипулационни техники

- В медицината – лечение на стерилитета, генетични заболявания
- В животновъдството – интензификация на размножителния процес, създване на хибриди....
- Научни изследвания

fppt.com

Условия за осъществяване на манипулациите

- Наличие на лабораторно оборудване – ламинарен бокс, СО-2 инкубатори, микроскопи, центрофуга.....
- Микроманипулатор
- Антивибрационна маса, лазер, апарат за електрофузия... (желателно)
- Среди и консумативи
- Обучен персонал

fppt.com

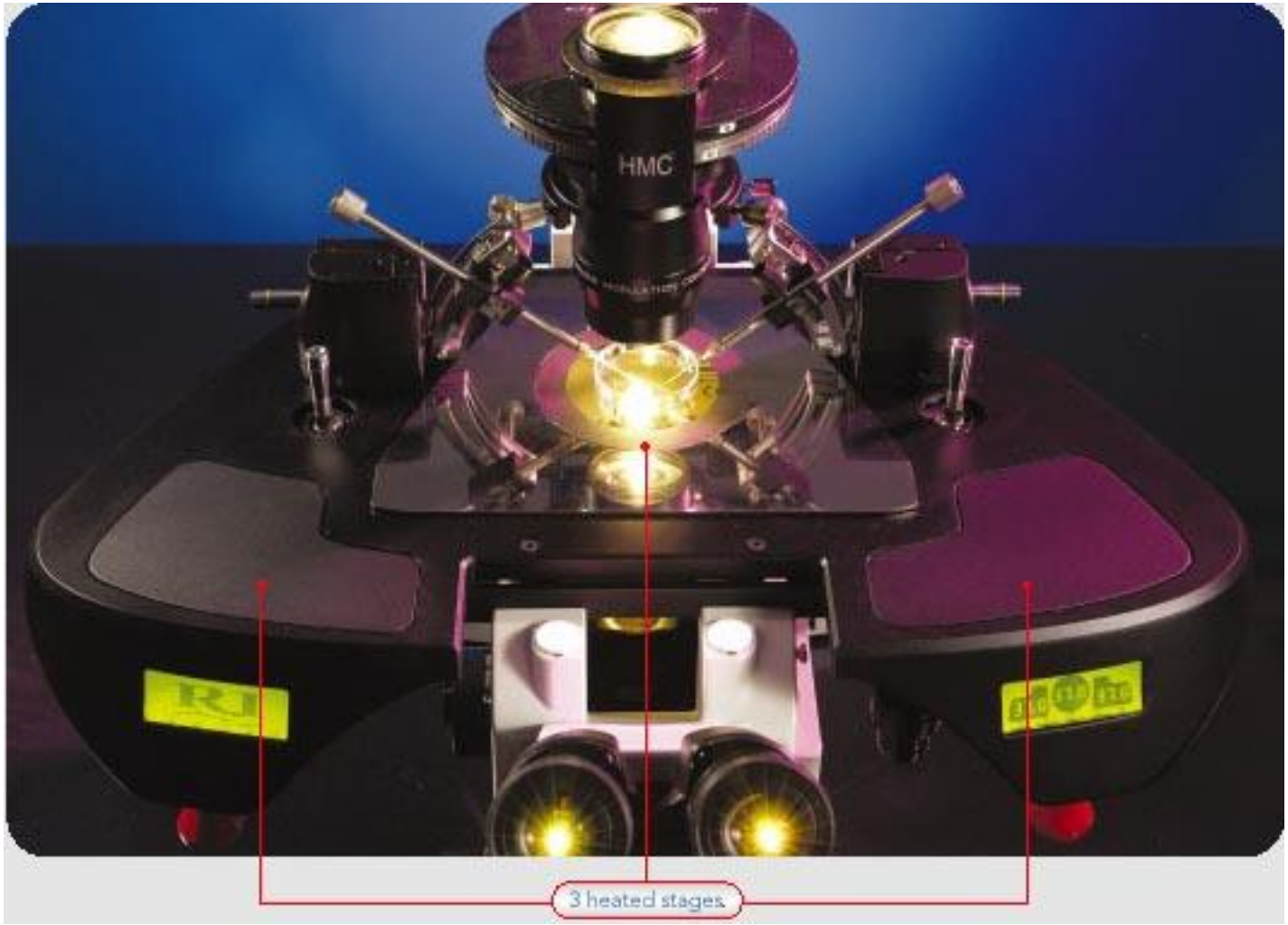
Микроманипулационни системи

- Инвертен микроскоп (с необходимия контраст)
- Микроманипулационна система
- Лазер, камера за видеонаблюдение, програма за анализ на образи и др.

fppt.com

Микроманипулационни системи

fppt.com



fppt.com

Видове микроманипулатори

Основна цел – да се трансформира движението от макроскалата към микроскалата, без това да увреди биологичните обекти, с които се работи

- **Според принципа си на действие:**

  механични, хидравлични, електрически, комбинирани

- **Фирми-производители:**

- Narishige
- Research Instruments – RI
- Eppendorf
- Leica
- Burleigh
- HarioMed

fppt.com

ICSI (Intra Cytoplasmic Sperm Injection)

Метод за оплождане чрез инжектиране на сперматозоид директно в цитоплазмата на ооцита (в MAR – програмите)

- Показания:

- лошо качество на семенната течност
- лошо качество на ооцитите (удебеляване, втърдяване на ZP)
- неуспешно оплождане в предишен цикъл IVF
- TESA, TESE, MESA. PESE…..
- предстояща PGD
- оплождане на ооцити след криоконсервация
- оплождане на ооцити след ин-витро матурация
- пациенти с HIV
- избягване на полиспермично оплождане

fppt.com

ICSI (Intra Cytoplasmic Sperm Injection)

- Историческа справка

1962г. – морски таралеж *(Hiramoto Y., Exp. Cell Res., 1962)*

1966г. – мишки *(Lin TP, Science 1966)*

1976г. – хамстер *(Uehara T., Yanagimachi R., Biol. Reprod., 1976)*

1988г. – зайци *(Iritani A. et al, Ann. NY Acad. Sci., 1988)*

1990г. – крави *(Goto K. et al, Vet. Res.1990)*

1992г. – човек *(Palermo GD et al, Lancet 1992)*

Към момента - 12 милиона деца родени след IVF, 1/2 от тях след ICSI.

fppt.com

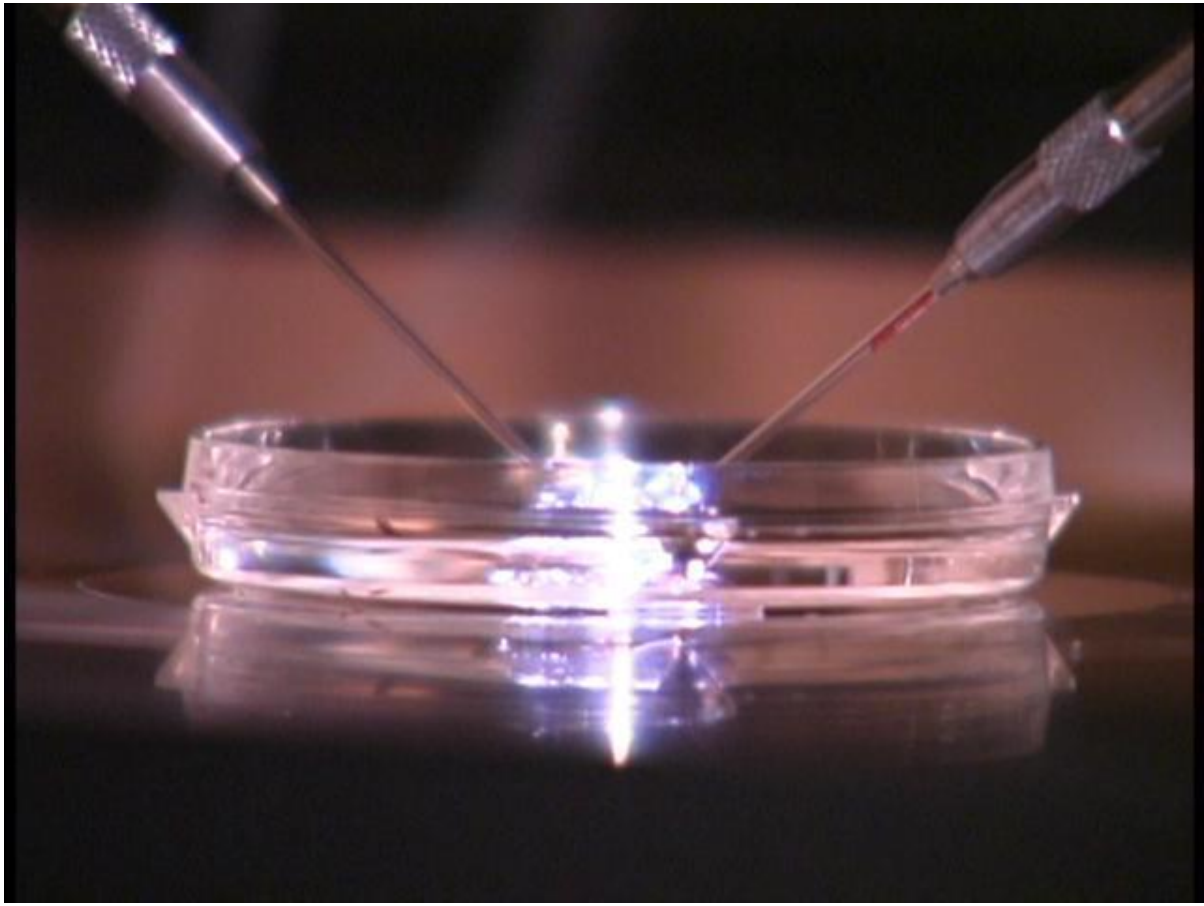
ICSI (Intra Cytoplasmic Sperm Injection)

- Етапи на процедурата:

- подготовка на средите, микроманипулатора и инструментите
- ооцитите се освобождават от кумулусните клетки (р-р на хиалуронидаза, 50-80 IU, 30-40 секунди), денудационна пипета
- предварително обработените сперматозоиди се поставят в PVP, подвижните мигрират към края на капката
- обездвижване (имобилизиране) на сперматозоида чрез “чупене” на опашката му
- засмукване на сперматозоида в инжекционната пипета
- позициониране на ооцита
- инжектиране на сперматозоида в цитоплазмата
- прехвърляне на оплодената яйцеклетка в среда за култивиране
- при необходимост – активация на ооцита

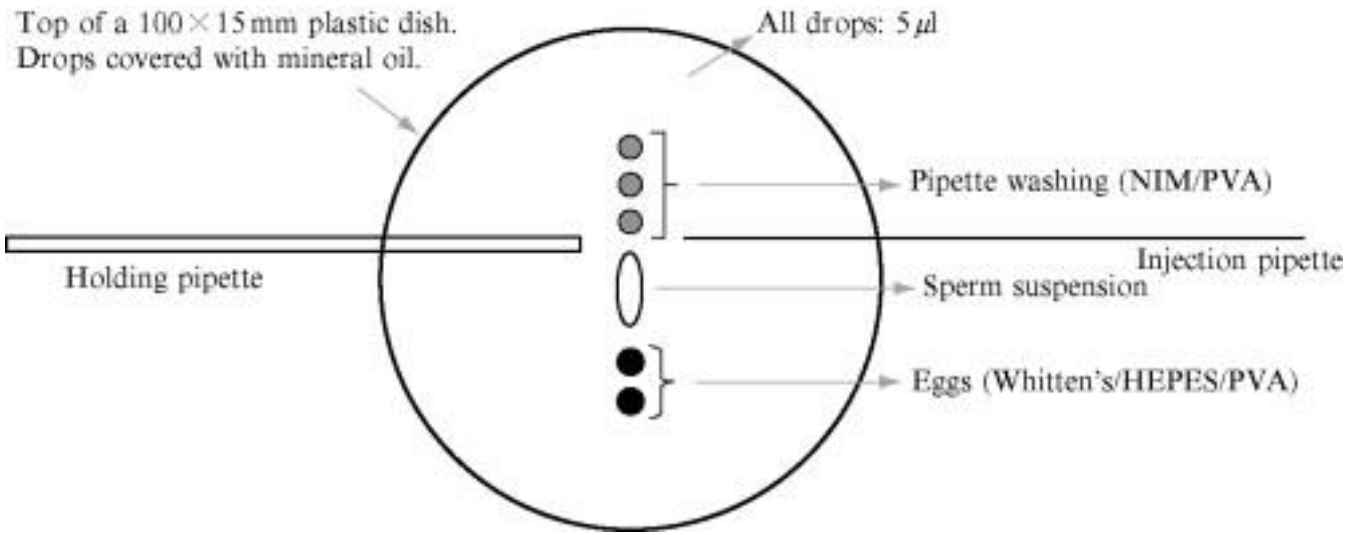
fppt.com

ICSI (Intra Cytoplasmic Sperm Injection)



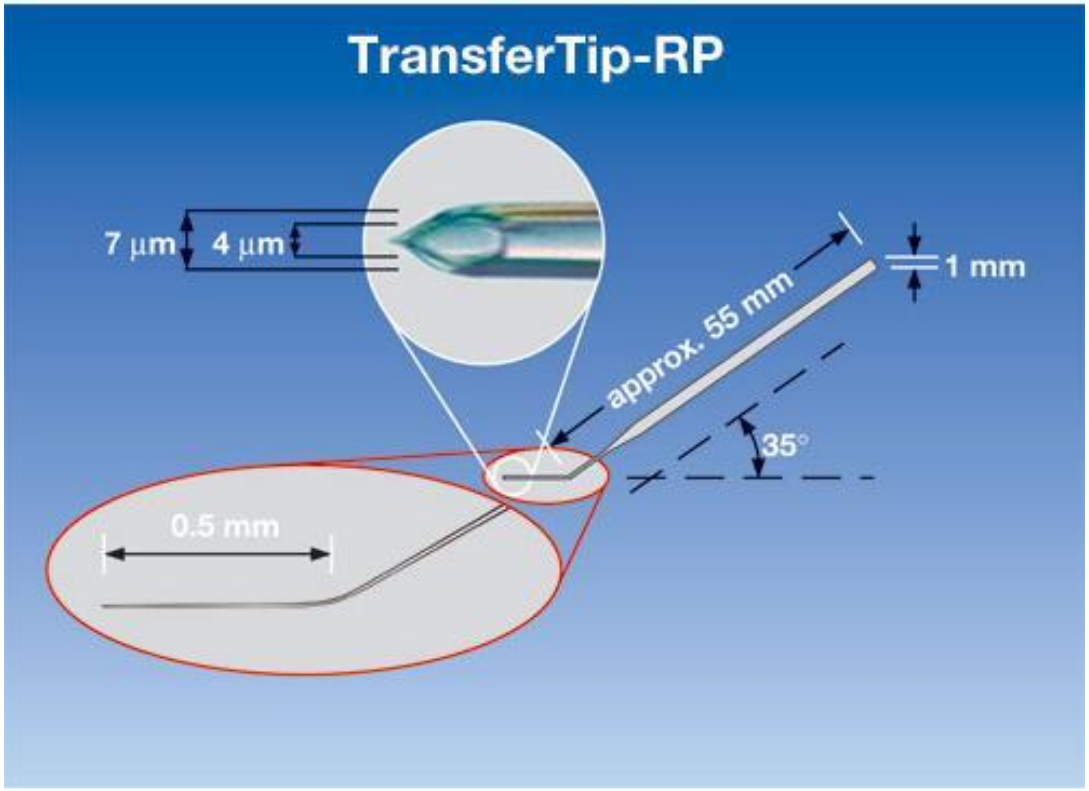
fppt.com

ICSI (Intra Cytoplasmic Sperm Injection)

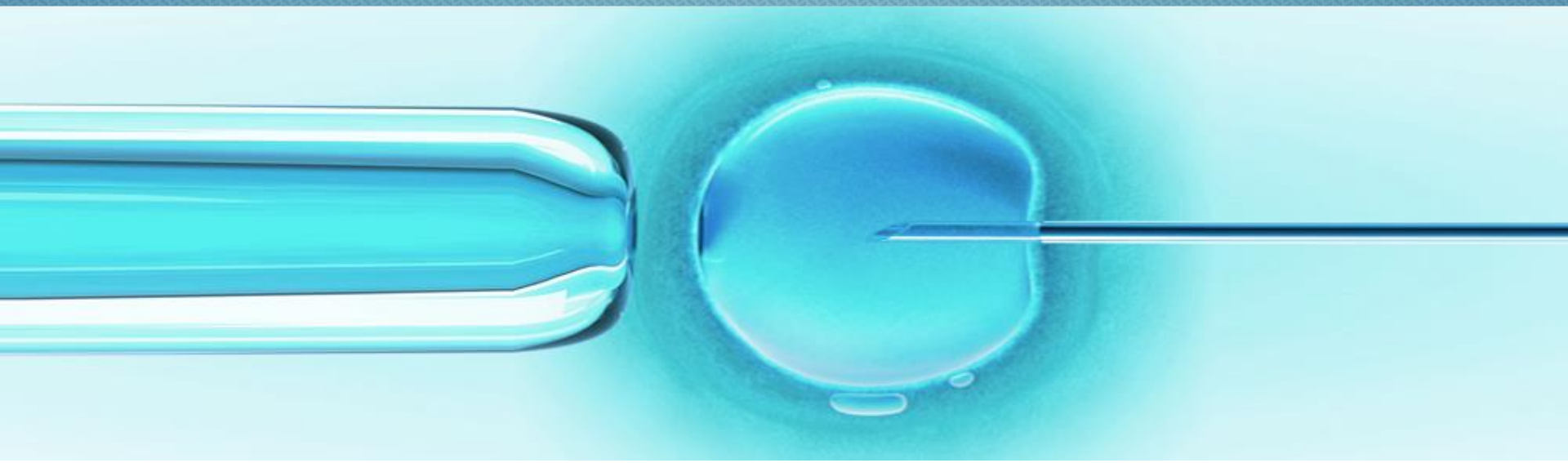


fppt.com

ICSI (Intra Cytoplasmic Sperm Injection)



fppt.com



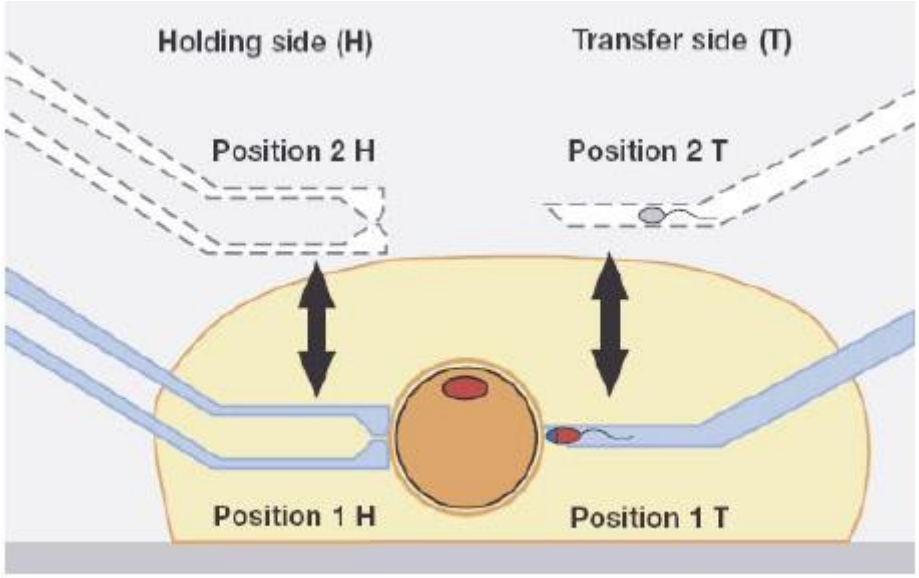
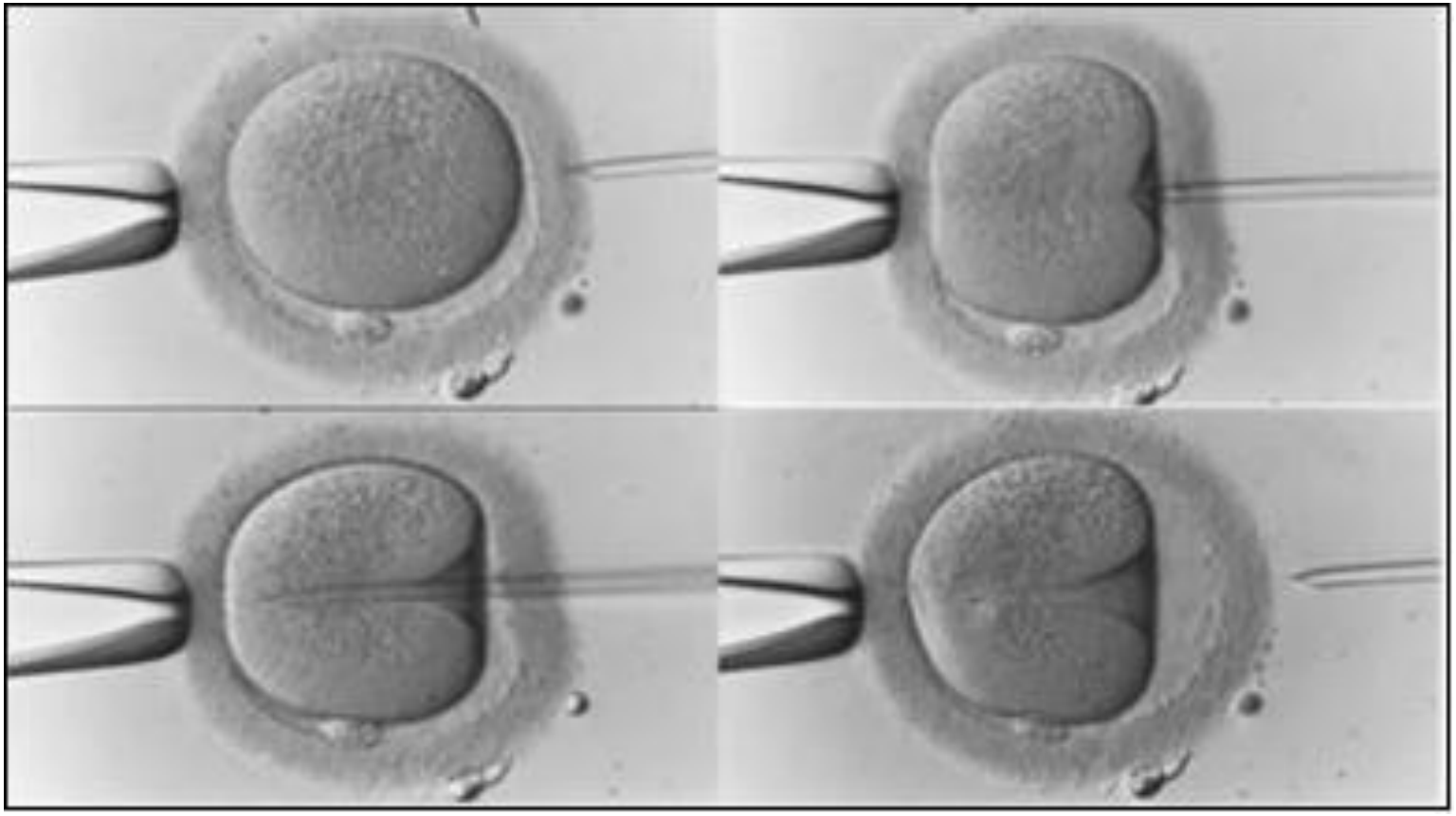


Figure 5: Storing of positions, schematic

fppt.com

ICSI (Intra Cytoplasmic Sperm Injection)



fppt.com

Активация на ооцита

Сперматозоидът съдържа фактори, активиращи ооцита и отговаршщи за декондензацията на хроматина /sperm-associated, oocyte-activating factor PLC-zeta и др./.

- Ооплазмата не съдържа ензими, разрушаващи мембраната на сперматозоида. Ако се ижектира интактен сперматозоид, в повечето случаи не се наблюдава оплождане.
- Необходимо е предварително да се наруши целостта на мембраната на сперматозоида (обикновено се прави чрез притискане на опашката му към дъното на чашката).
- Нарушава се интегритета на мембраната, Na/K помпи, което води до загуба на мембранния потенциал.

fppt.com

Индуцирана активация на ооцита

Физични фактори

- електрически импулси
- засмукване на цитоплазмата на ооцита

Химически агенти

- Ca-ionophore A23187
- Инжектиране на 0.1M $CaCl_2$
- $SrCl_2.6H_2O$
- Ionomycin и др.

fppt.com

ICSI (Intra Cytoplasmic Sperm Injection)

- Перспективни направления

- **IMSI** *(intracytoplasmic morphologically selected sperm injection)* – позволява увеличение до 16000.

- **Piezoelectric micromanipulator**

- **ARISI** *(Automated Robotic Intracytoplasmic Sperm Injection)* автоматизиране на част от процесите

fppt.com

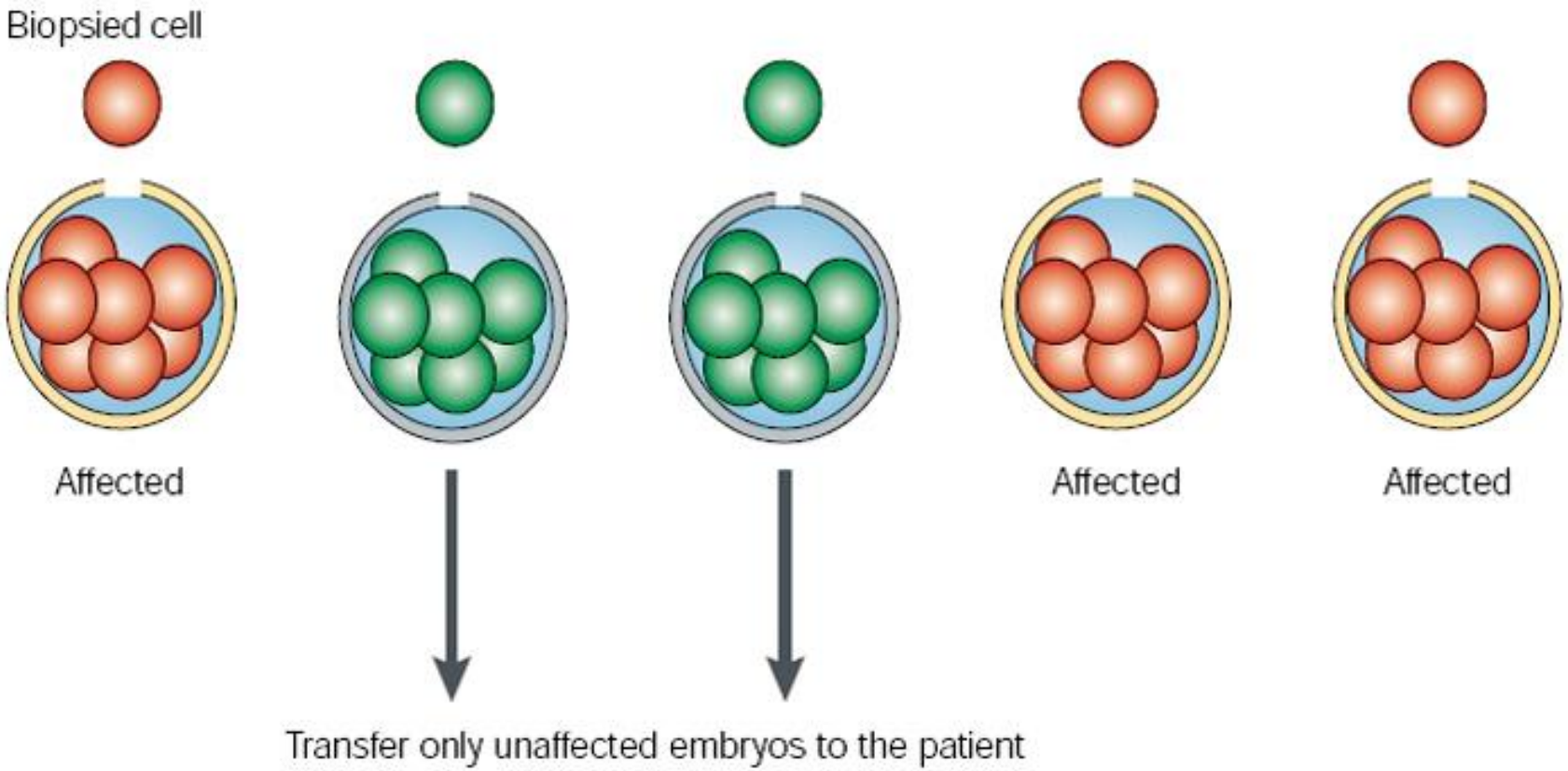
PGD (Preimplantation Genetic Diagnosis)

Индикации

- Двойки, при които във фамилната история има Х-свързани болести (свързани с пола) – рискът да се засегнат ембрионите е около 25%, т.е. половината ембриони от мъжки пол
- Двойки с хромозомни транслокации, имащи неуспешни предишни цикли IVF и аборти или деца с ментални увреждания
- Носители на автозомни рецесивни заболявания – 25% риск
- Носители на автозомни доминантни заболявания – 50% риск
- Генетични заболявания (Single gene defects)
- Тежък мъжки фактор и др.

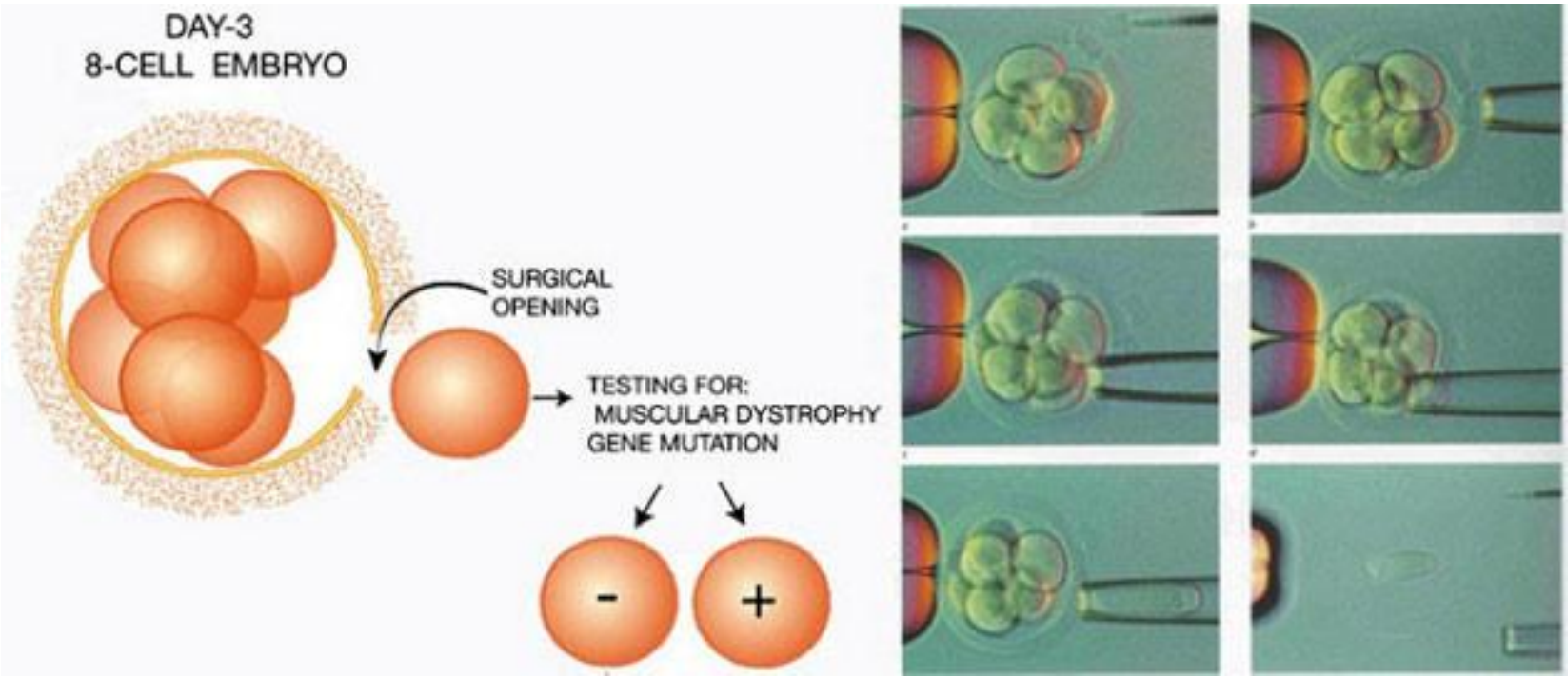
fppt.com

PGD (Preimplantation Genetic Diagnosis)



fppt.com

PGD (Preimplantation Genetic Diagnosis)



fppt.com

Етапи на процеса (PGD)

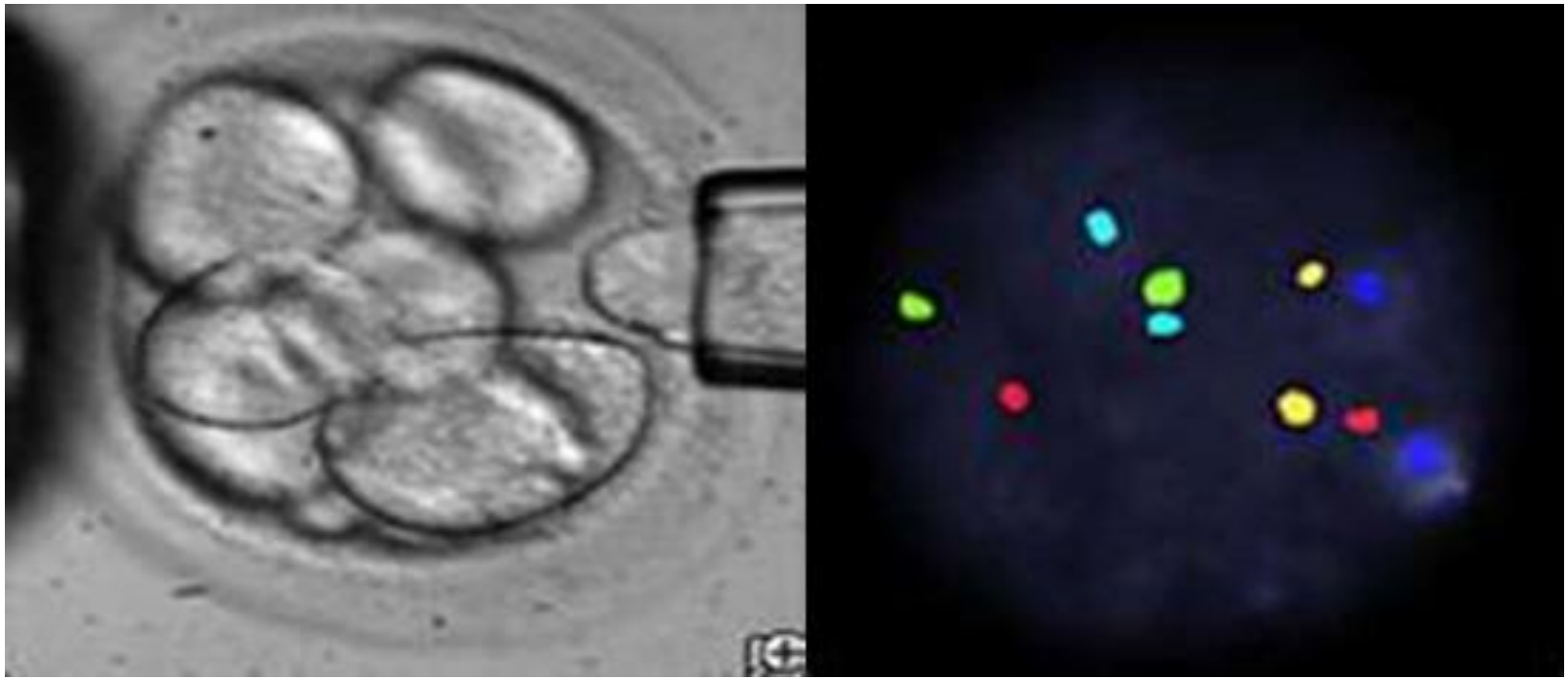
- Информирано съгласие
- Получаване на яйцеклетки, ембриони.....
- Прехвърляне на ембриона в среда без калций и магнезий
- Отваряне на зоната с помощта на лазер или кисел р-р на Тироде
- Биопсия на полярното телце, 1-2 бластомера или клетки от трофектодермата
- Изследване на изолираните клетки (FISH, PCR,….)
- Трансфериране в матката на незасегнати ембриони

fppt.com

PGD (Preimplantation Genetic Diagnosis)

fppt.com

PGD (Preimplantation Genetic Diagnosis)



fppt.com

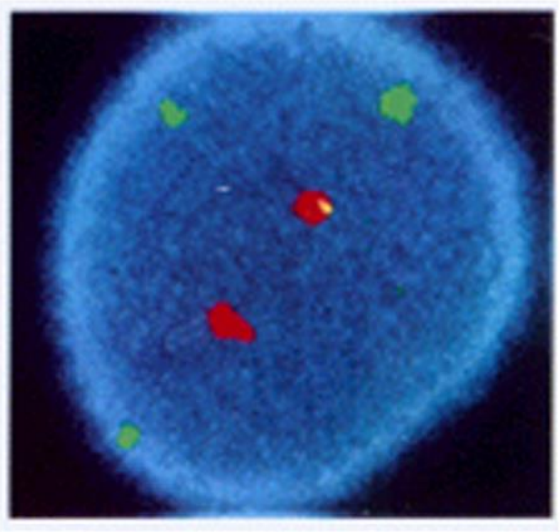
PGD (Preimplantation Genetic Diagnosis)

fppt.com

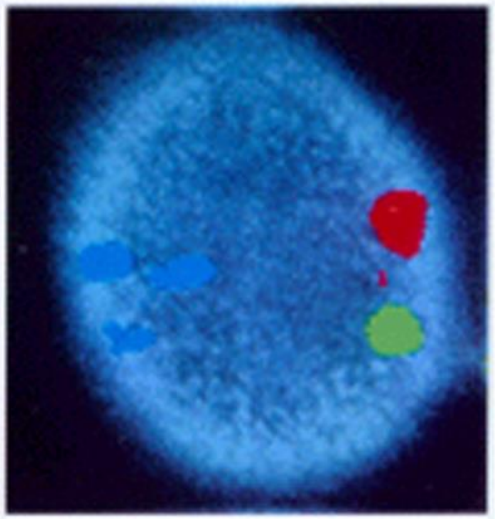
PGD (Preimplantation Genetic Diagnosis)

fppt.com

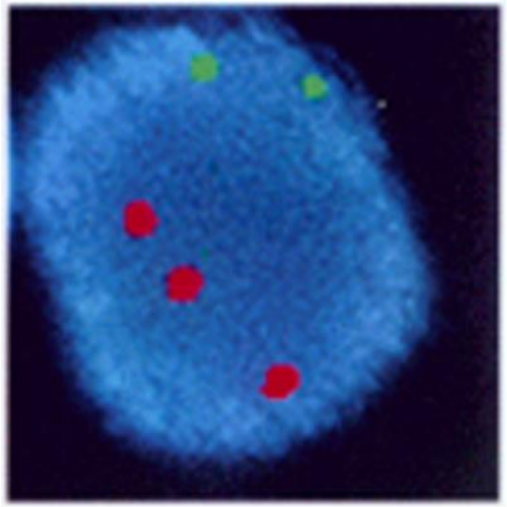
Хромозомни аномалии



Trisomy 13



Trisomy 18

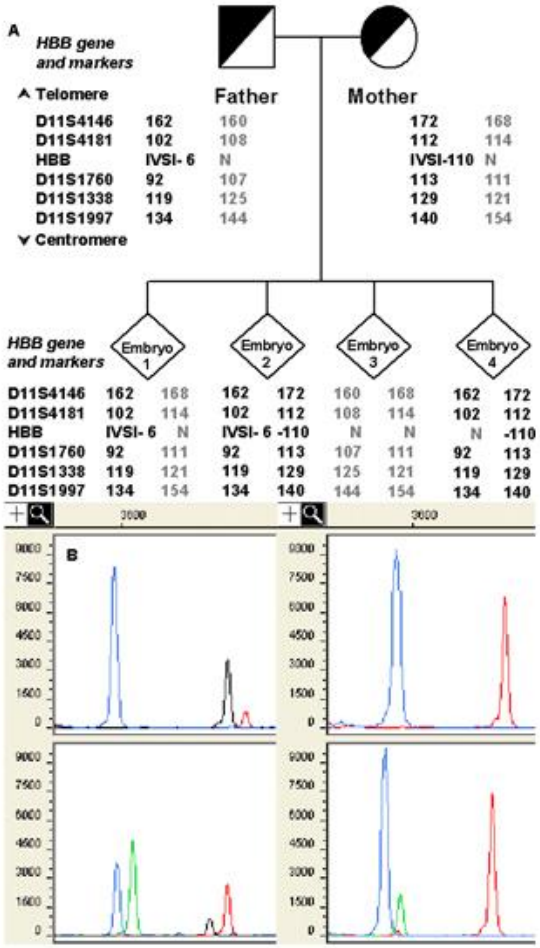


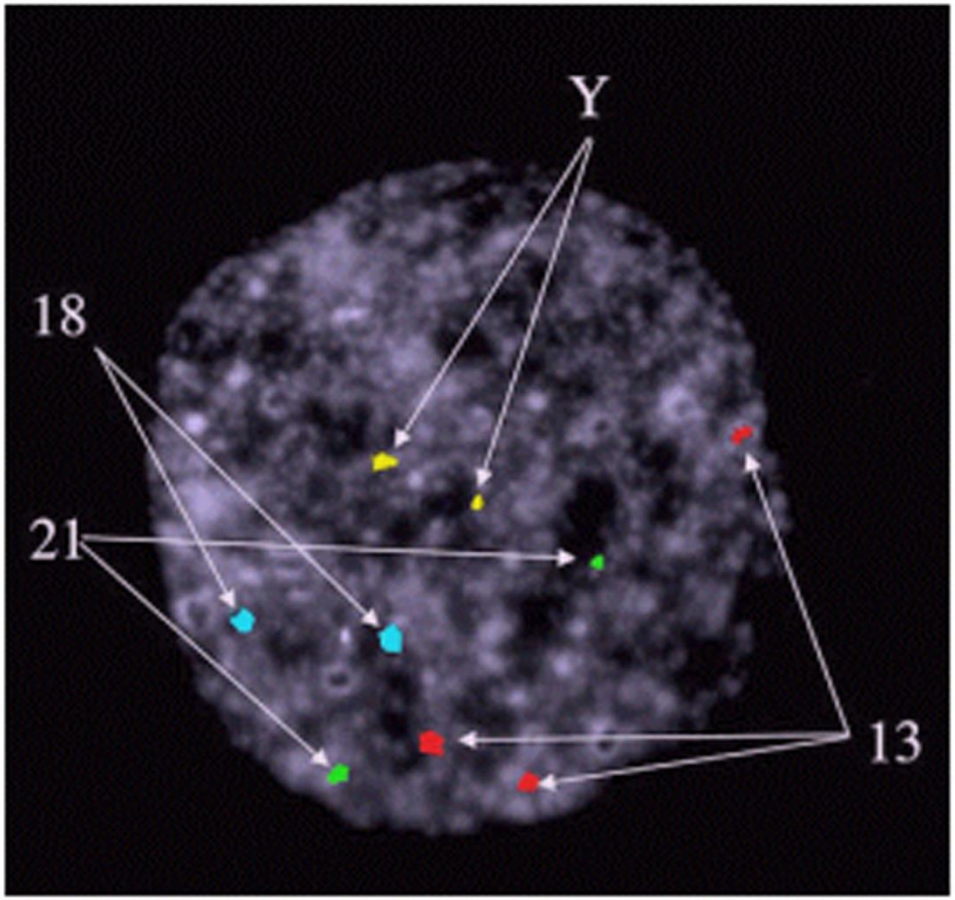
Trisomy 21

Abnormalities of chromosomes 13, 18, 21

fppt.com

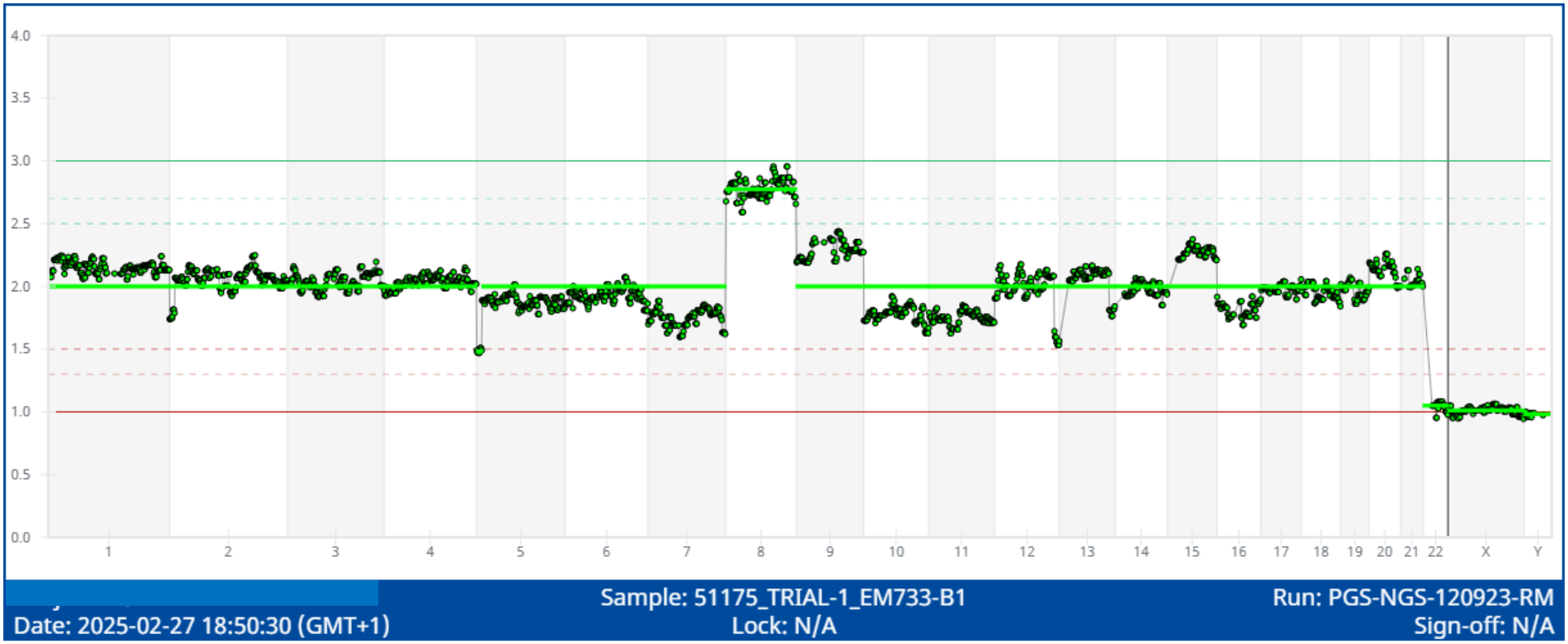
Генетични изследвания





Multiple FISH demonstrating chromosomes 13 (triploid), 18, 21, and XX

fppt.com


4.0
3.5
3.0
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
X
Y
Sample: 51175_TRIAL-1_EM733-B1
Run: PGS-NGS-120923-RM
Date: 2025-02-27 18:50:30 (GMT+1)
Lock: N/A
Sign-off: N/A

fppt.com

PGD - нерешени проблеми

- Риск ембрионите (яйцеклетките) да бъдат увредени при биопсията
- Биопсия на полярно телце – дава информация само за ооците
- Биопсия на бластомер – “мозаицизъм” на метода
- Необходимост от допълнителна апаратура
- Достоверност на метода (около 70-75%)
- Цена и др.

fppt.com

Dream

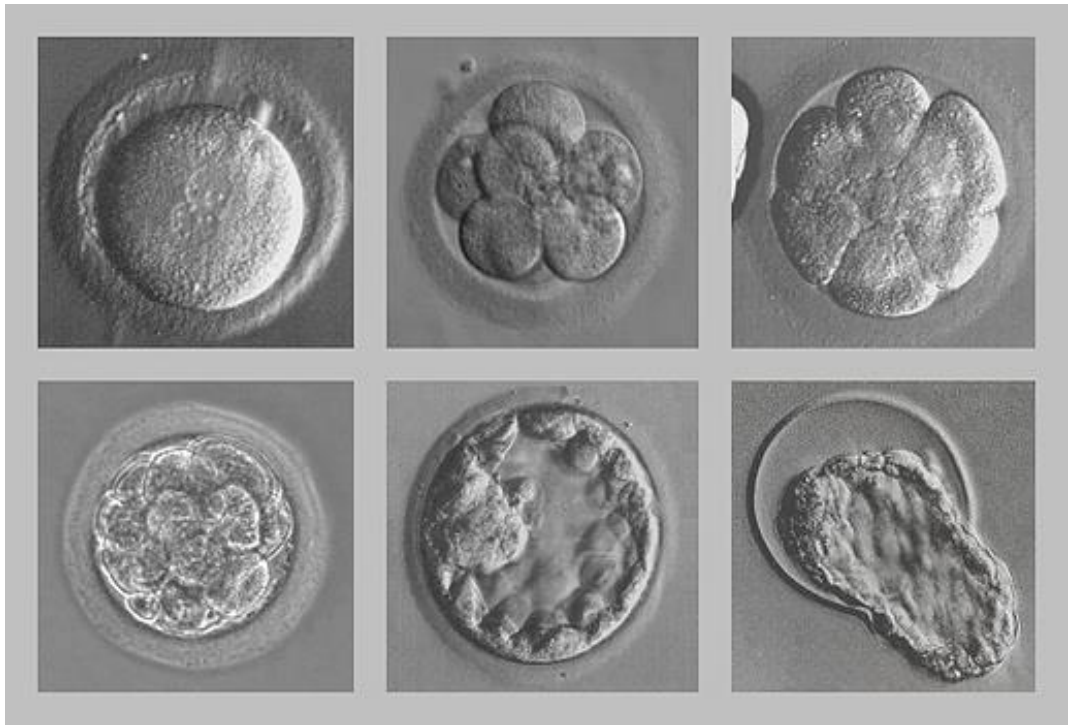
Reproduction Genetics

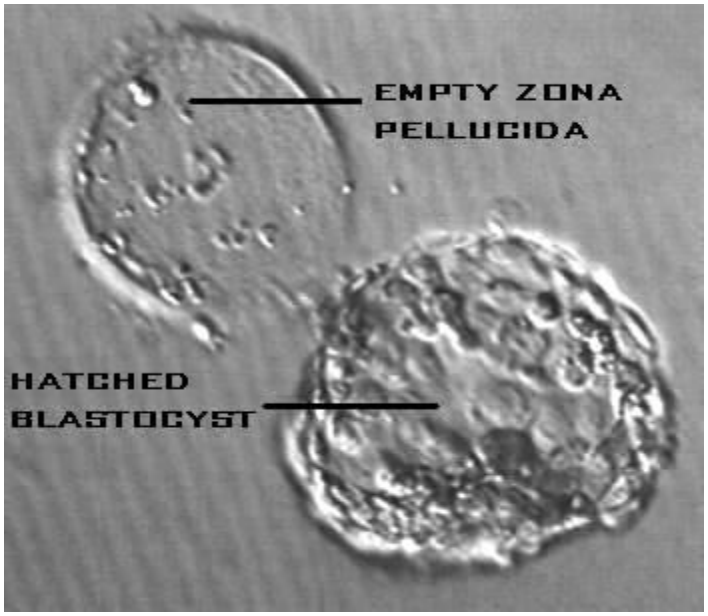
PGD

?

Elimination of Genetic Diseases

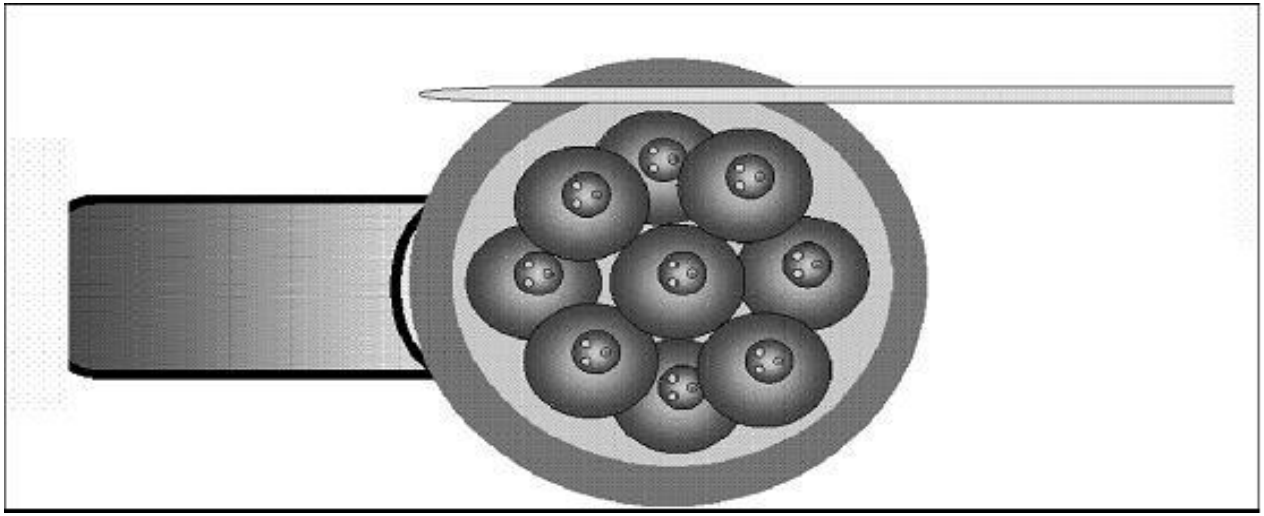
Zona drilling and assisted hatching

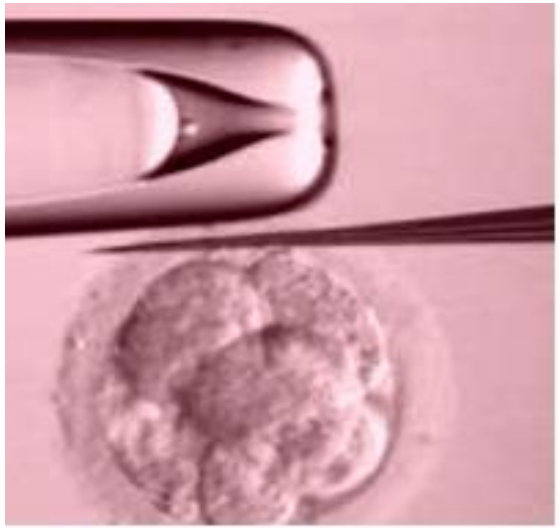




fppt.com

Механично

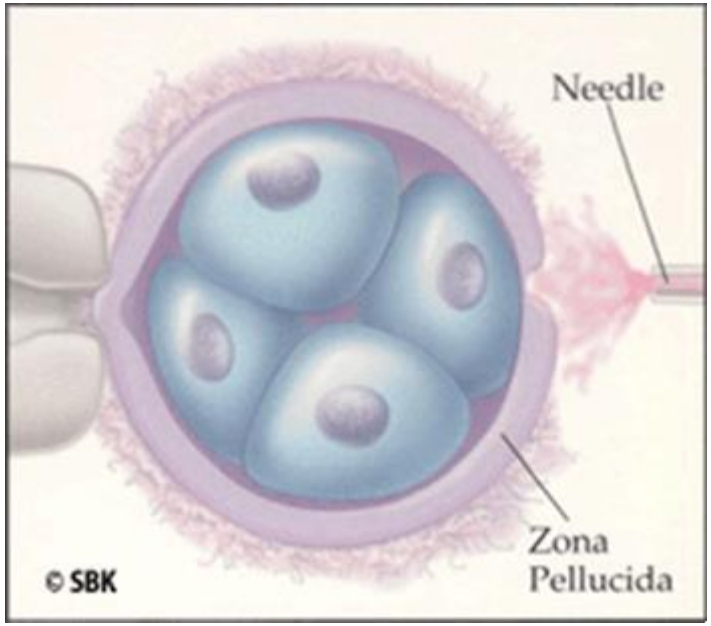


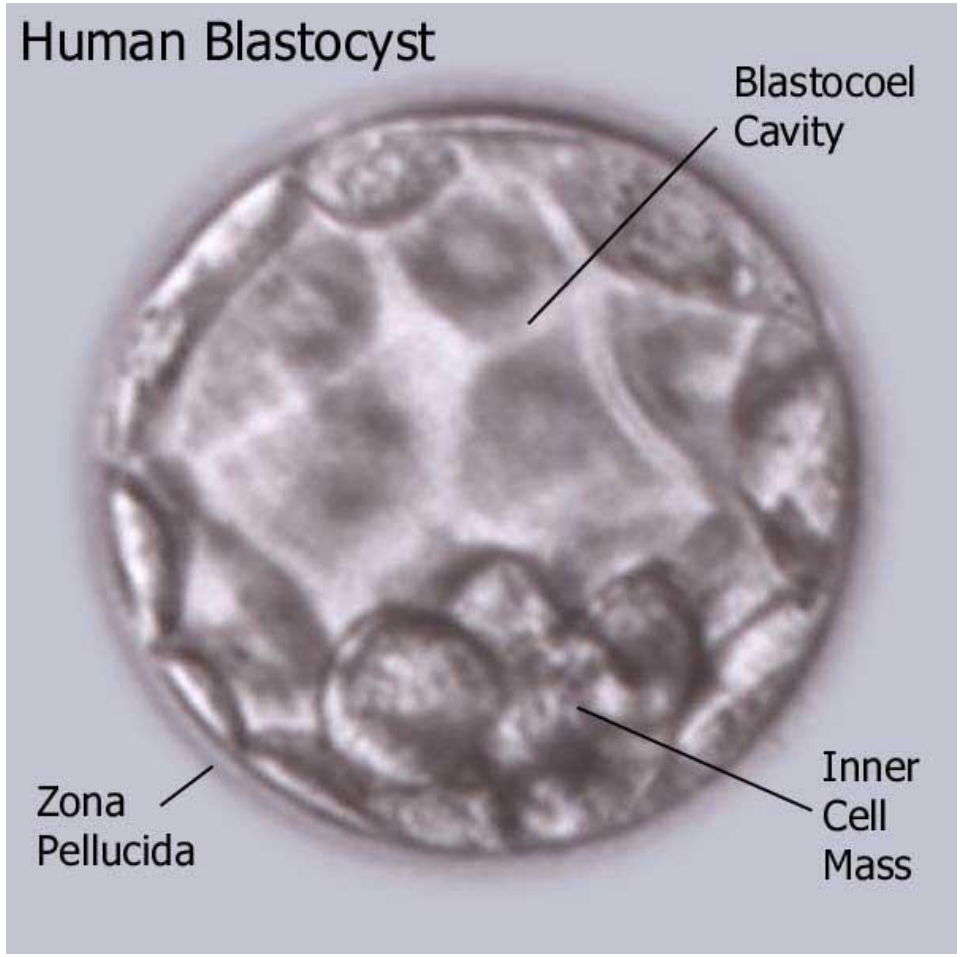


fppt.com

Химично

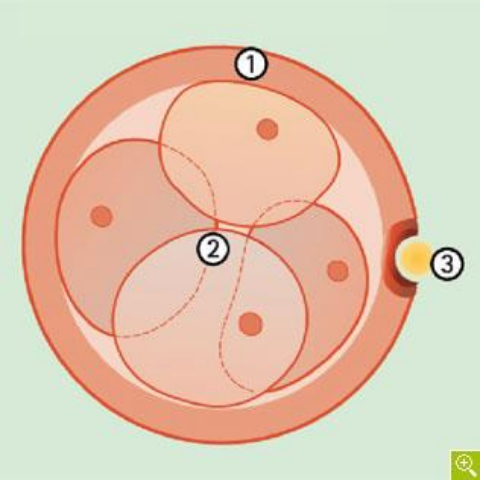
- Кисел р-р на Тироде
- р-р на проназа

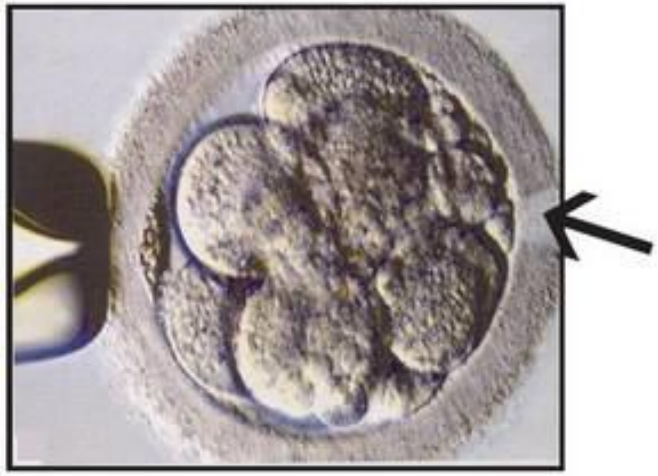


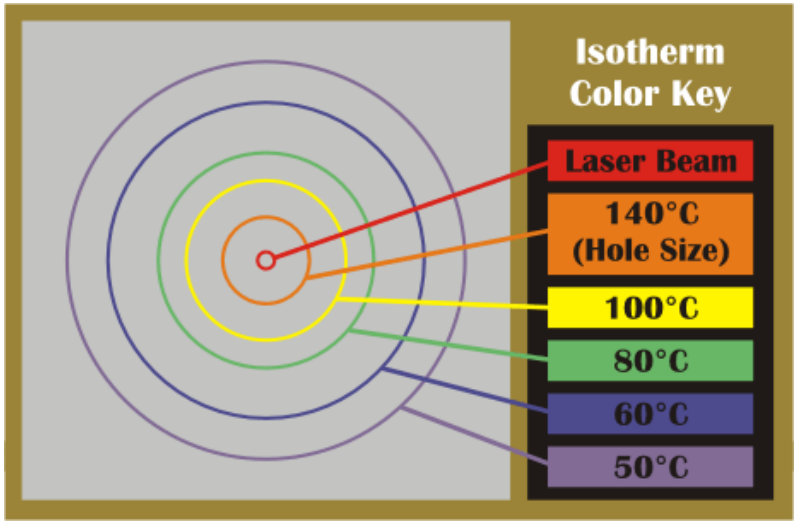


fppt.com

Лазер







fppt.com

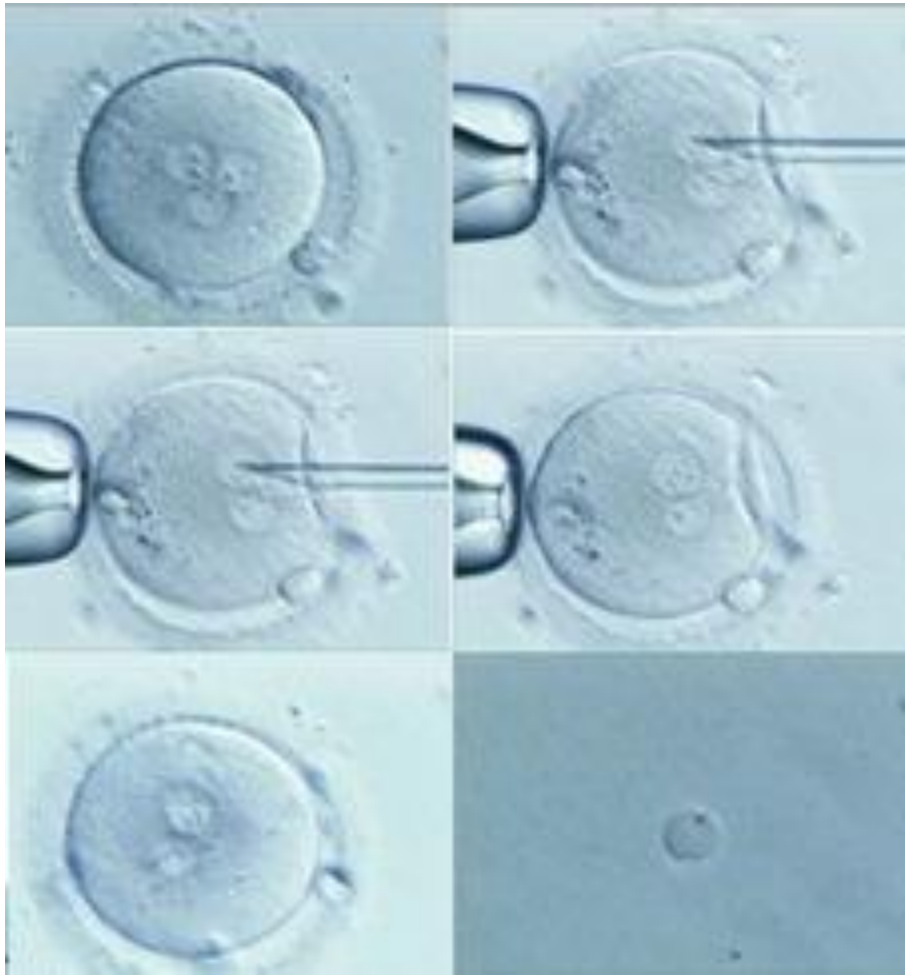
File Setup Video Settings Objectives Target Zoom Help
Color Key
Laser Beam
60°C
50°C
Laser - Validation
Non-Clinical
Research Use Only
Power %
Pulse
Hide Target
Measurement Toolbox
Tool Type
Report
Video Record and Playback
Time Lapse Mode
Image Capture
Capture Overlay
Auto Capture on Laser Fire
Images
Videos
Status: Laser Controller Connected on Com Port 1
Current Calibration Factor: 0.6111
2007/09/24 3:30:09 PM

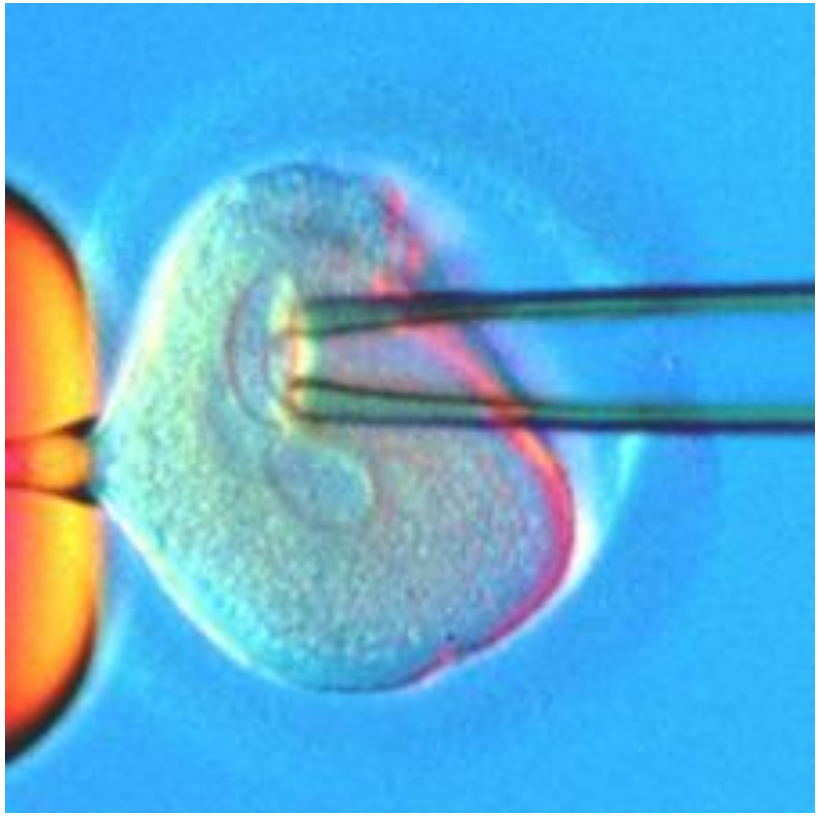
fppt.com

Отделяне на фрагменти

fppt.com

Removal of Pronucleus





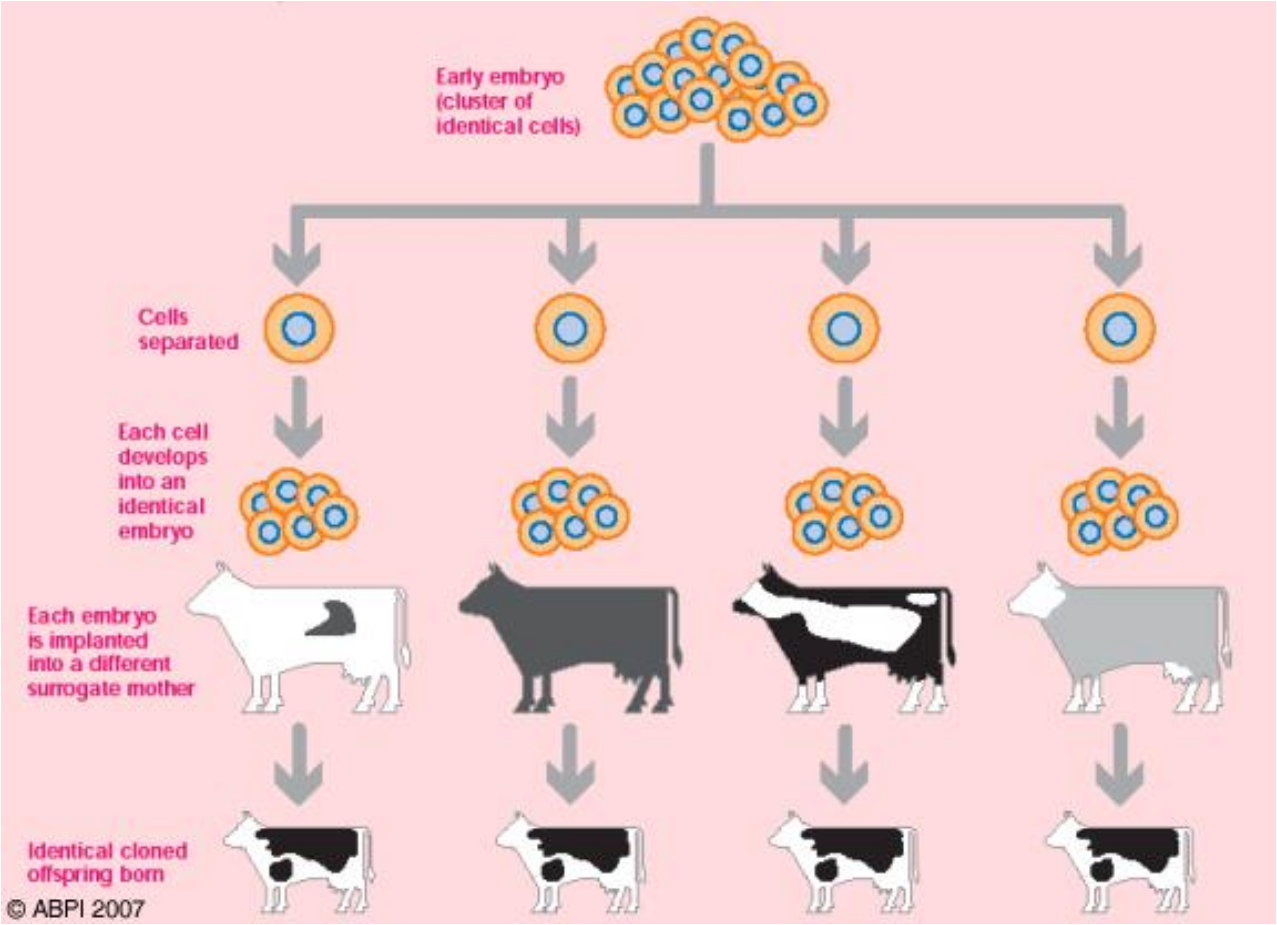
fppt.com

Клониране

- **Клониране на ембриона** - получаване на монозиготни близнаци или тризнаци;
- **Репродуктивно клониране** - получаване на “двойници” на възрастни индивиди;
- **Терапевтично клониране** - получаване на стволови клетки от предимплантационни ембриони

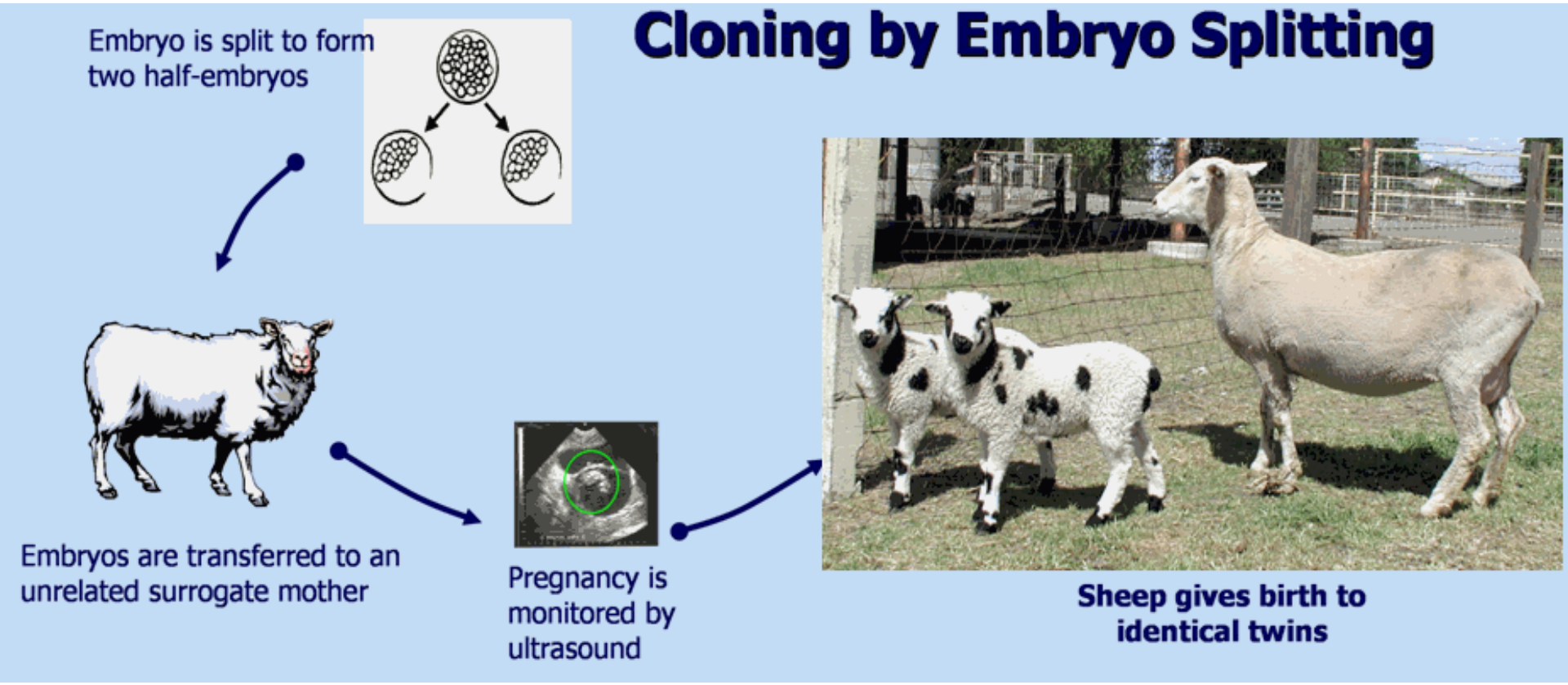
fppt.com

Клониране /получаване на идентични близнаци/



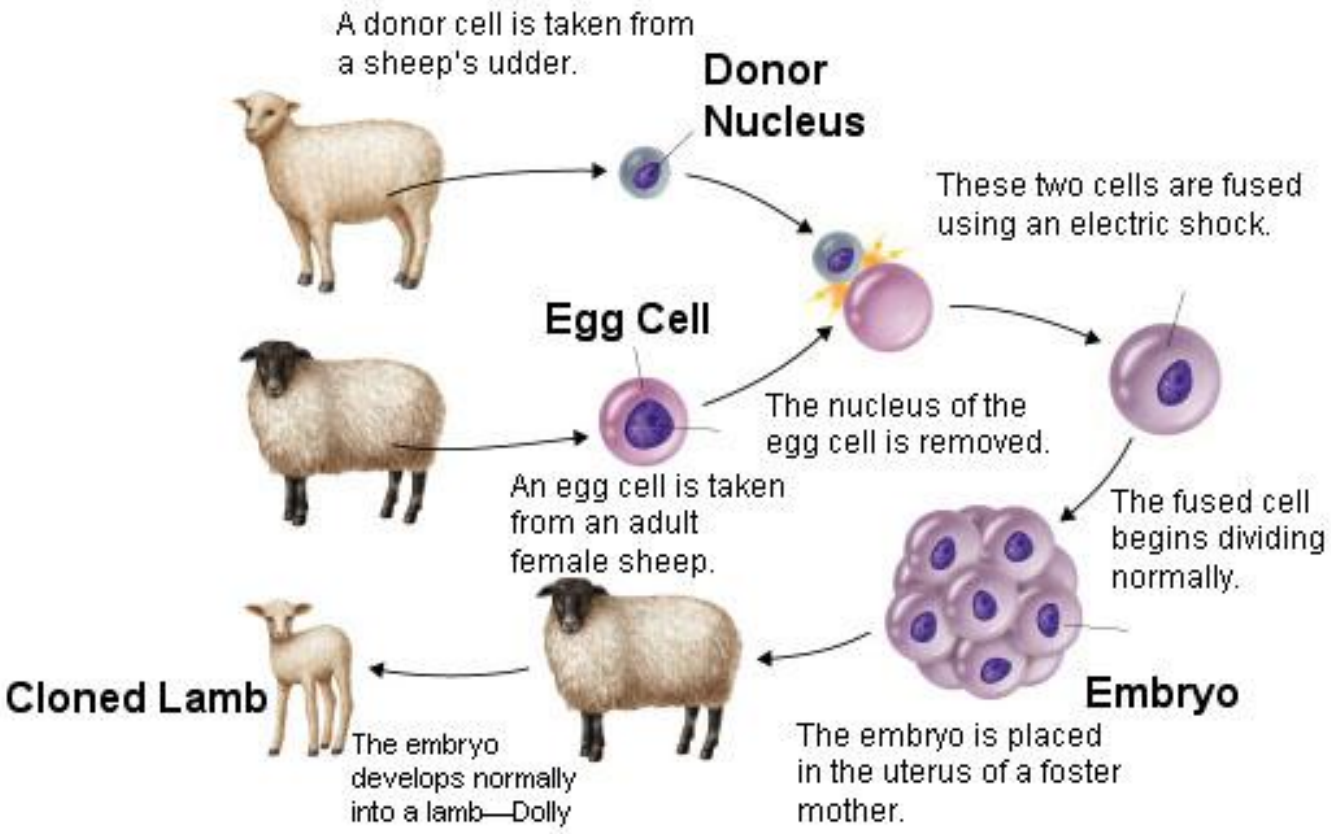
fppt.com

Клониране чрез “сплитинг”



fppt.com

Репродуктивно клониране



fppt.com

1996г. – овцата Доли

fppt.com

Историческа справка

- 1996г. – овца (Великобритания)
- 1997г. – мишка (САЩ)
- 1998г. – крава (Япония)
- 2000г. – козал, свиня, муфлон (Китай)
- 2001г. – котка, гаур, заек (САЩ)
- 2003г. – бантенг, муле, кон, елен, дива котка, плъх (САЩ)
- 2004г. – дрозофила (Канада)
- 2005г. – куче, азиатски бивол (Южна Корея)
- 2006г. – хорек (САЩ)
- 2007г. – вълк, маймуна (Южна Корея)
- 2008г. – мъртва мишка /след 16-годишно съхранение в замразено състояние/ (Япония)
- 2009г. – камила, букардо (ОАЕ)
- 2010г. – бик /за борба с бикове/ (Испания)
- Общо 22 вида са успешно клонирани към момента

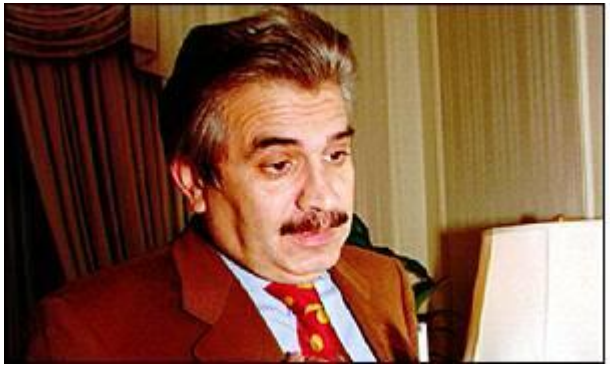
fppt.com

fppt.com

Sooam Biotech Research Foundation

fppt.com

Клониране на хора

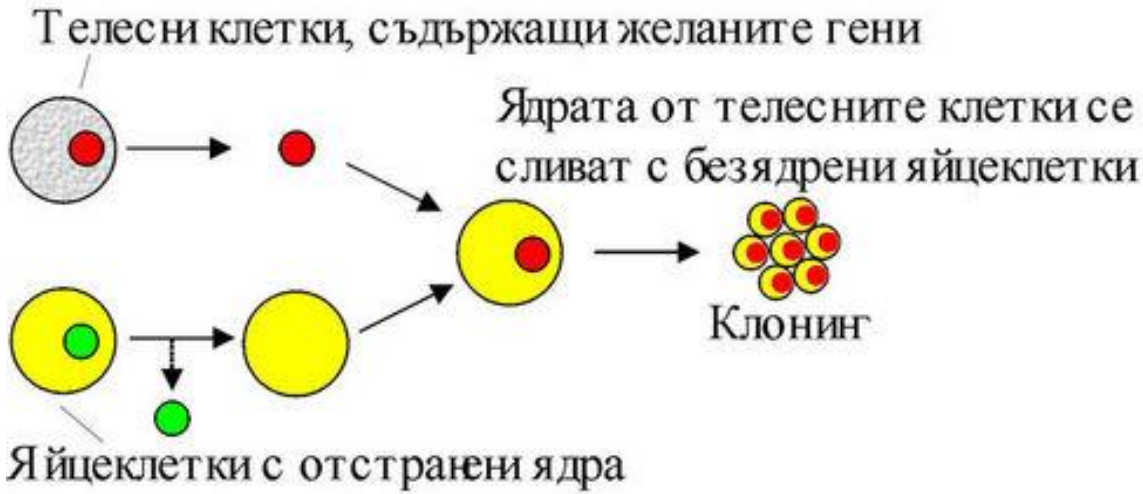


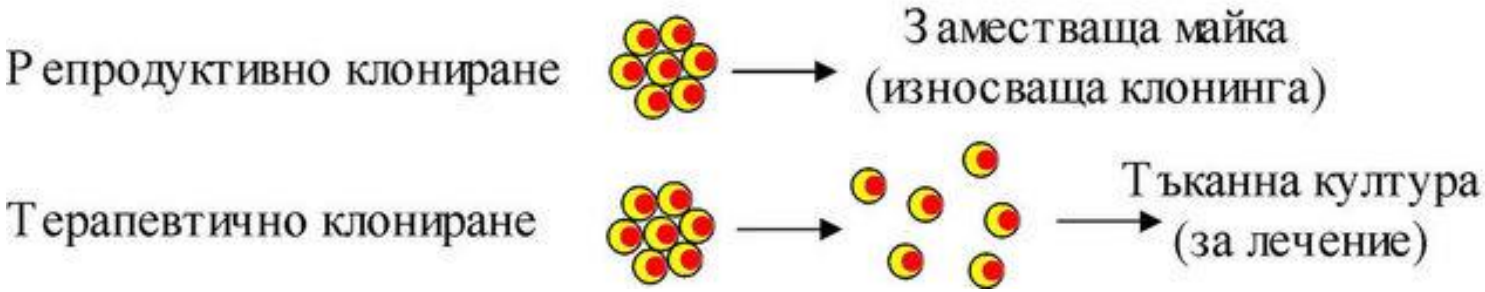
First cloned baby "born on 26 December“

By Emma Young
27 December 2002
The world’s first cloned baby was born on 26 December, claims the Bahamas-based cloning company Clonaid. But there has been no independent confirmation of the claim.
The girl, named Eve by the cloning team, was said to have been born by Caesarean section at 1155 EST. The birth at an undisclosed location went “very well”, said Brigitte Boisselier, president of Clonaid. The company was formed in 1997 by the Raelian cult, which believes people are clones of aliens.
“The baby is very healthy. She is doing fine,” Roisselier told a press conference in Hollywood, Florida, on Friday. The seven-pound baby is a clone of a 31-year-old American woman, whose partner is infertile, she said.

fppt.com

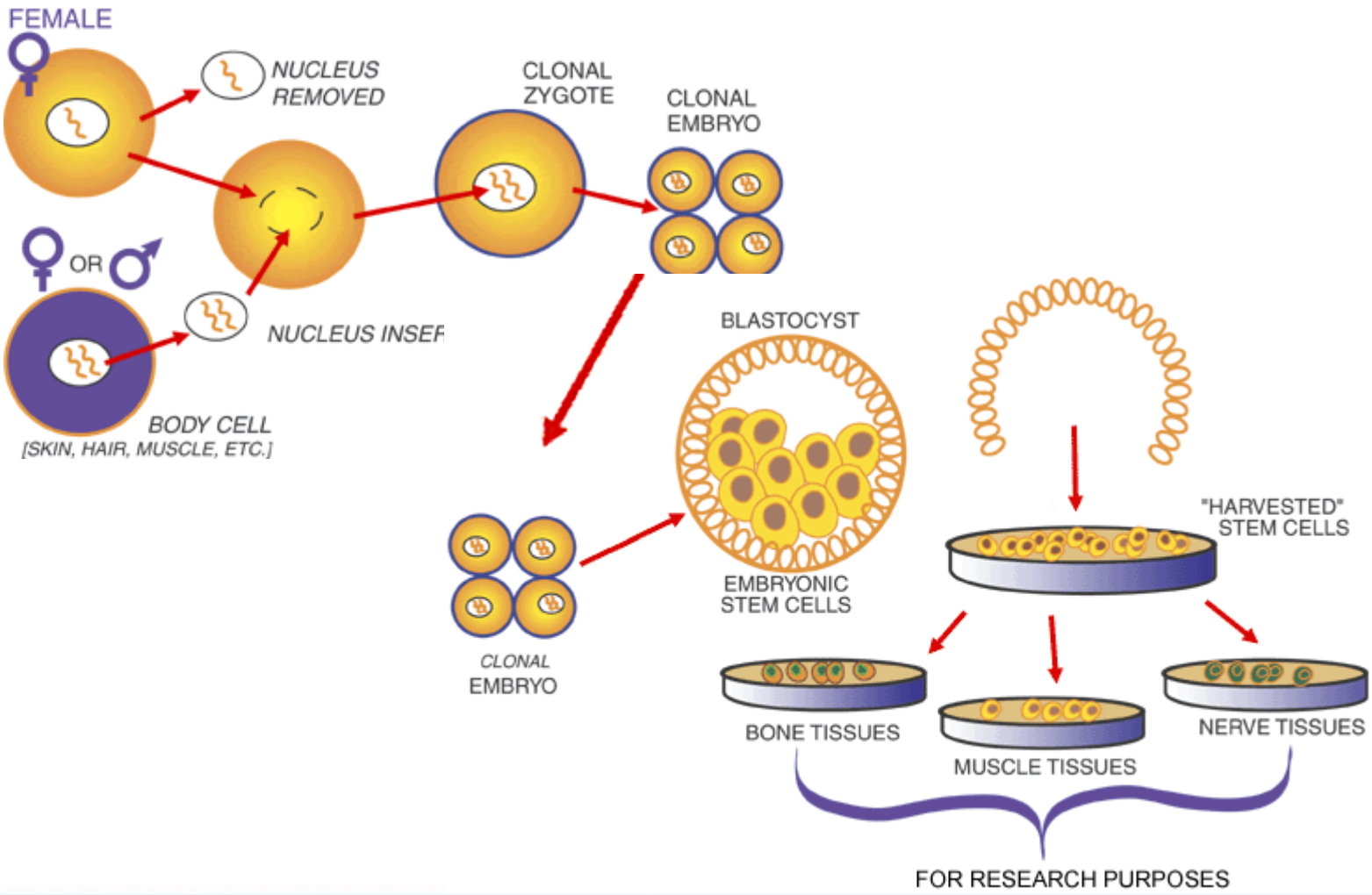
Репродуктивно vs терапевтично клониране





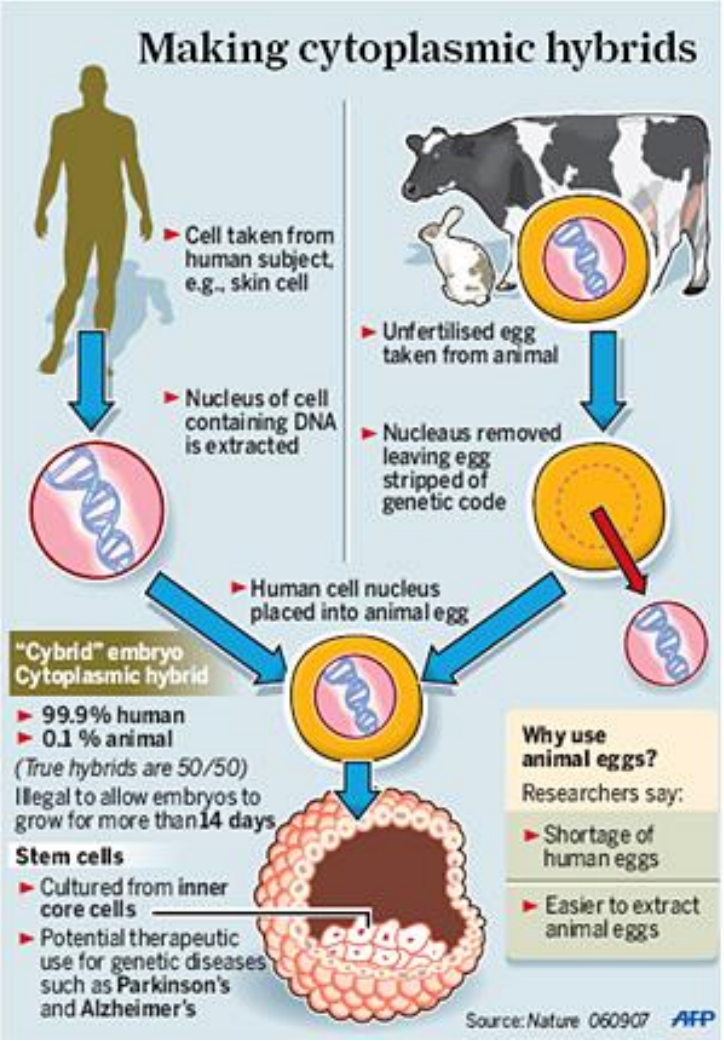
fppt.com

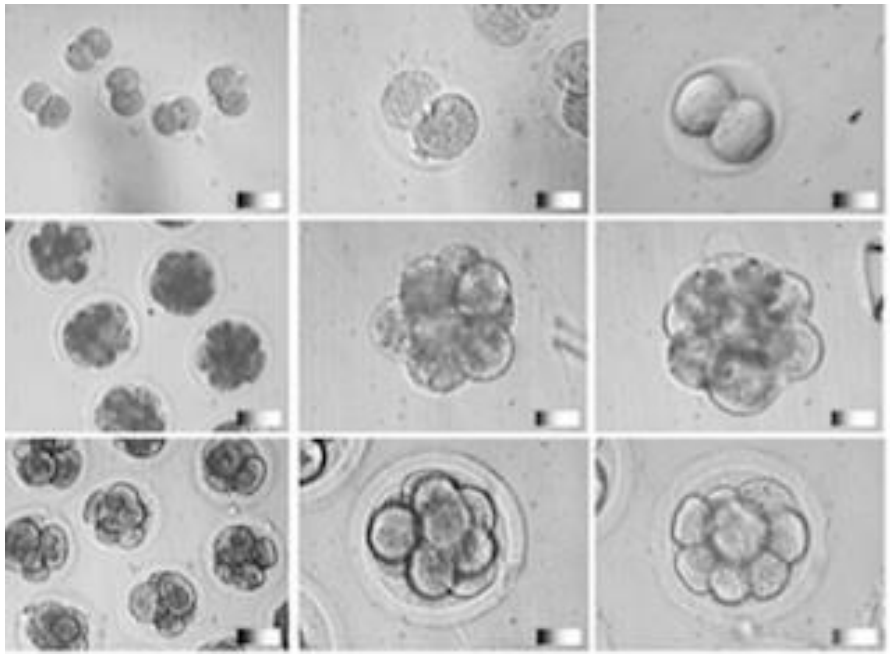
Терапевтично клониране



fppt.com

Хибридни ембриони





fppt.com

Нерешени проблеми

- Законови и етични ограничения
- Съпротива от страна на църквата

- Технологични проблеми:

- Ниска успеваемост на процеса (напр. Доли – от 283 ембриона само едно раждане)
- Синдром “на големия плод”, увеличена период на бременност
- По-ниска продължителност на живота на клонингите?
- Заболявания (хидроалантоис, респираторни проблеми, имунна дисфункция, заболявания на бъбреците, черния дроб, мозъка, циркулаторен дистрес и др.)

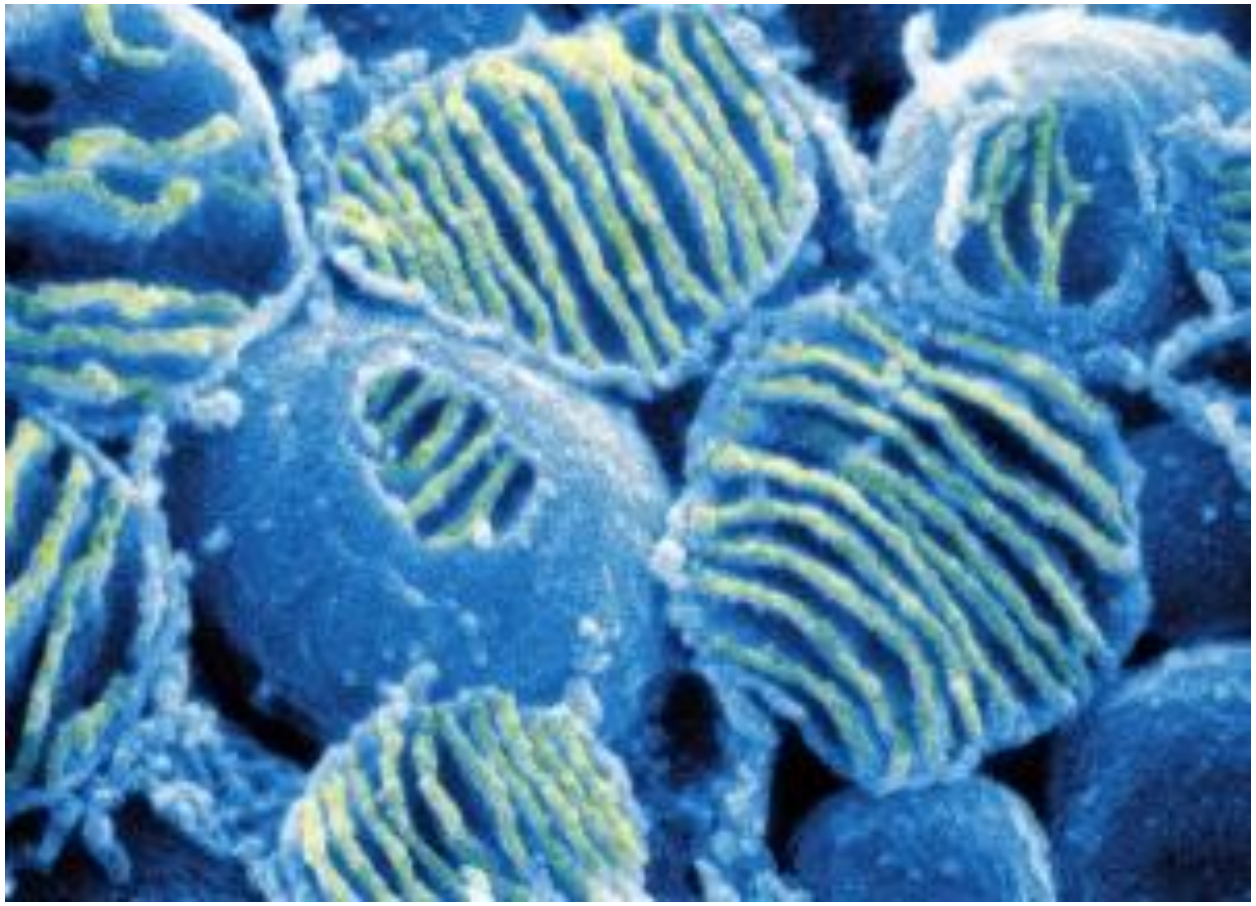
fppt.com

Трансфер на цитоплазма

- Cytoplasmic transfer (CT) – инжектиране на донорска цитоплазма в ооцита
- Митохондриални дефекти (1:4000 новородени)

fppt.com

Митохондрии



fppt.com

Митохондрии

- Всички клетки, с изключение на еритроцитите, съдържат митохондрии

- Соматични клетки – 200 до 2000 митохондрии
- Сперматозоид – 16 митохондрии
- Примордиален фоликул – 10000 митохондрии
- Зряла яйцеклетка – 100000 митохондрии

В предимплантационния ембрион не се образуват нови митохондрии

Съществува прагово ниво на АТФ, необходимо за клетъчното деление и развитие на ранния ембрион

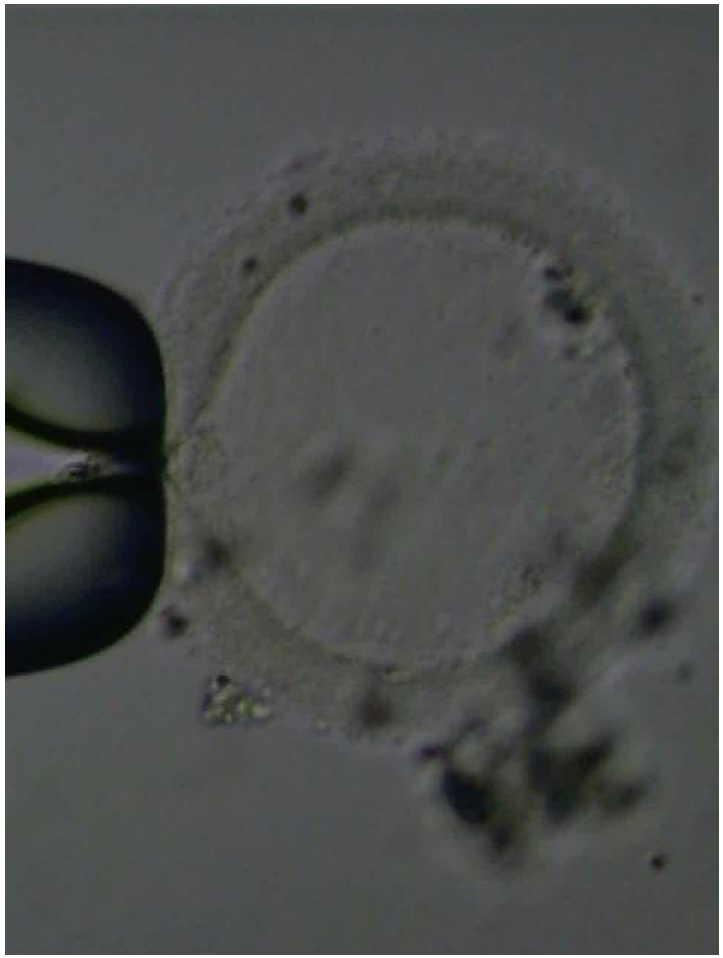
fppt.com

Замразяване на сперматозоиди в “зона пелуцида”

- Наличие на единични сперматозоиди
- Риск от загуба в процеса на криоконсервация

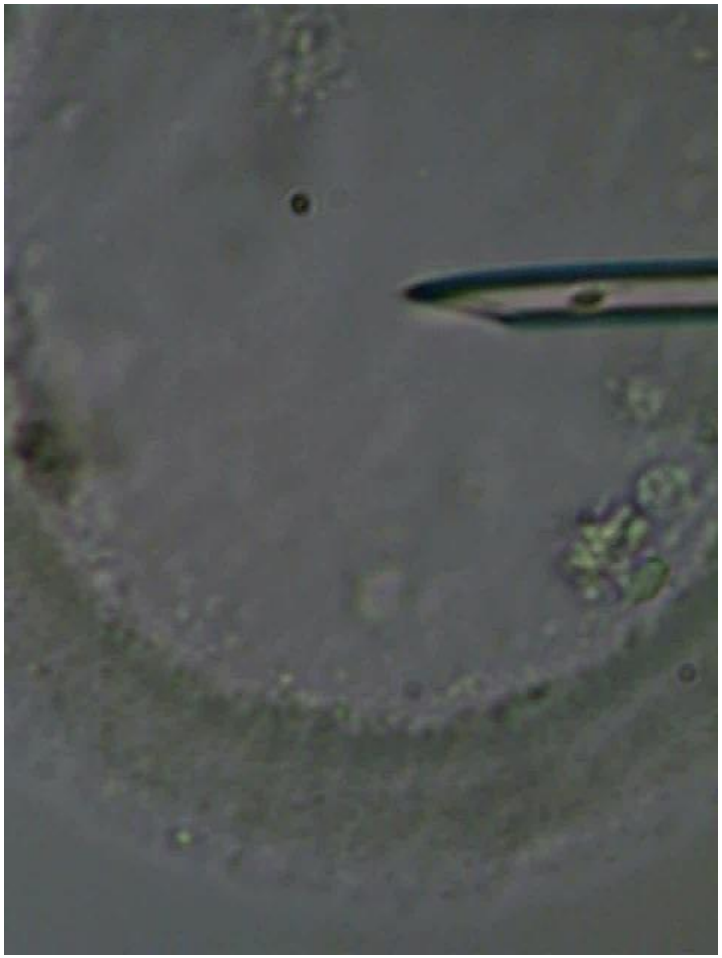
fppt.com

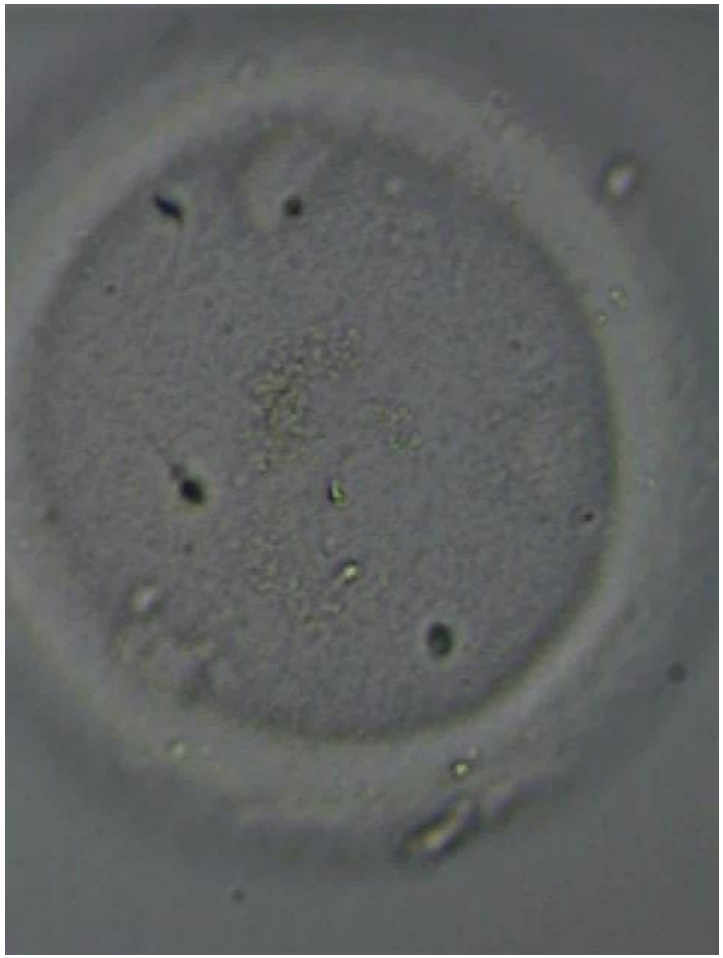
Отделяне на цитоплазмата



fppt.com

Инжектиране на сперматозоиди в празна ZP





fppt.com

Криоконсервация

- Криопротективна среда - *Sperm Freeze medium*
- 0,25мл пайети
- Програмно замразяване

fppt.com

Резултати

- 55% от сперматозоидите възстановяват подвижността си след размразяване
- 17-20% загуби на сперматозоиди
- Процент на оплождане с размразени сперматозоиди – 65%
- Получени две бременности (2/8=25%)

fppt.com

Получаване на ембрионални стволови клетки

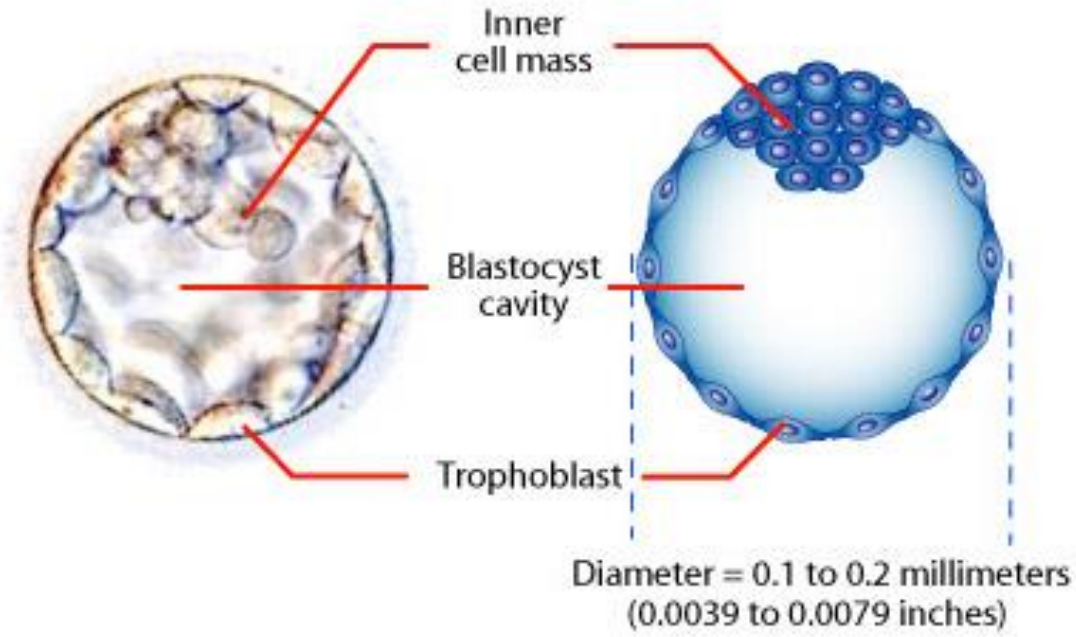
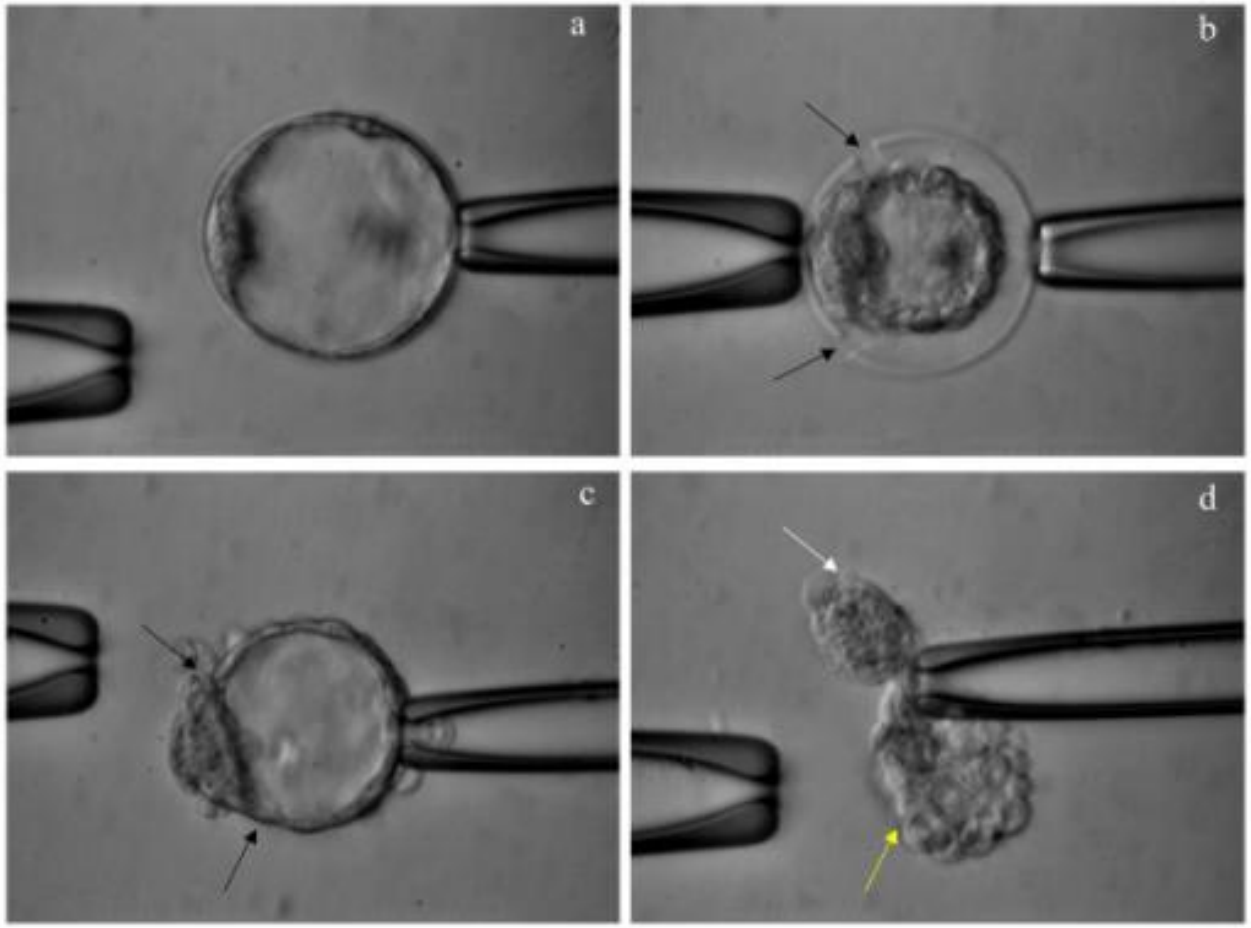


Illustration by Cell Imaging Core of the Center for Reproductive Sciences.

fppt.com

Получаване на ембрионални стволови клетки



fppt.com

Инжектиране на екстрацелуларни криопротектори в ооцита

fppt.com

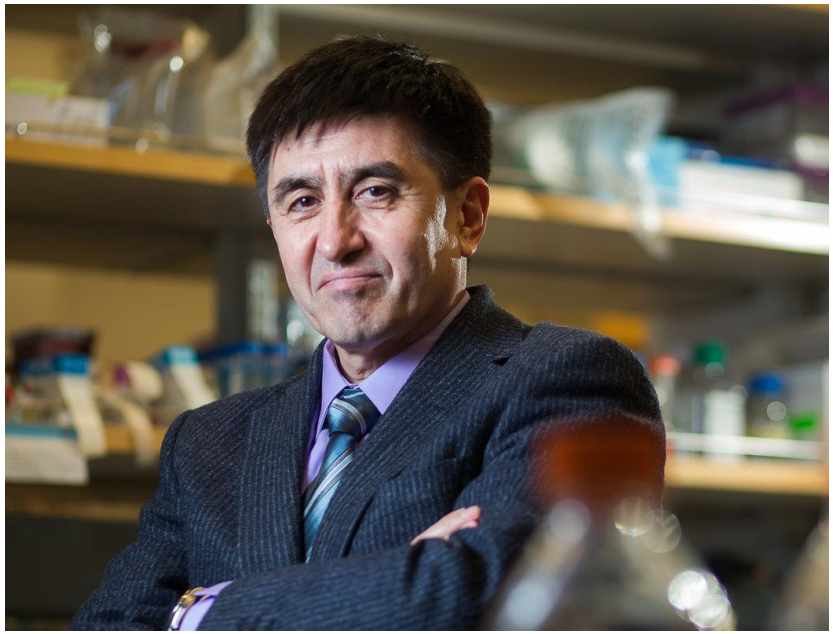
Редактиране на ембрионалния геном

Случаят на Хъ Цзянкуей

В края на ноември 2018 година в интервю за Associated Press китайски учен съобщава, че успешно е използвал технологията за генно редактиране CRISPR/Cas9 върху човешки ембриони в процедура за оплождане инвитро. Целта на редакцията е чрез промяна в гена CCR5 да се предотврати възможността родените деца да се заразят с вируса на СПИН.

Случаят е оповестен седмици след раждането на близначките Лулу и Нана. Световните агенции разпространяват новината за раждането на първите генетично модифицирани бебета в Китай, появили се въпреки опасенията за рисковете, свързани с новата технология и етическите въпроси, които тя предизвиква, въпреки противоречивите обществени нагласи и въпреки правните ограничения за нейното прилагане върху човешки ембриони, които са налице в много страни. Сензацията е както по отношение на намесата в човешкия геном и „образцовото“, според думите на изследователя, постижение, така и по отношение на лекотата, с която е пренебрегнал правилата.

fppt.com



fppt.com

Модифициране на генома

Много хора имат алергия към котки. За целта са създадени първите генномодифицирани хипоалергични котки (не предизвикват алергия)

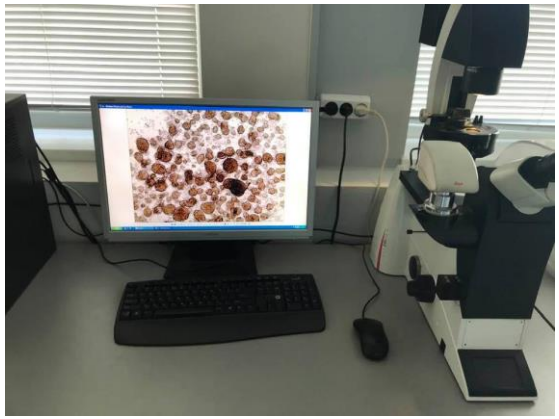
mRNAs of C2-1 and Cas9 to be microinjected into the feline zygotes

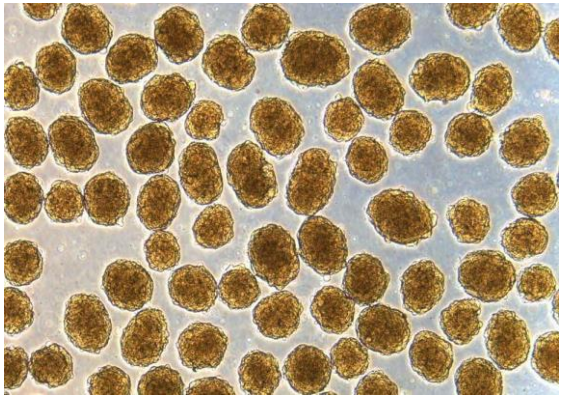
e

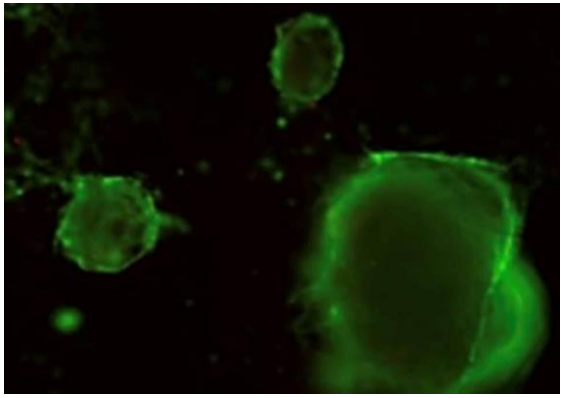
ID	CH2 sequence (5′ -> 3′)	Indel
WT	GCTGACACGATGAGGGGGGCACTGCTTG TGCTGGCATTGCTGG	0
Heavy (KS-M-001, Mosaic)	GCTGACACGATGAGGGGGGCACTGCTTG TGCTGGCATTGCTGG GCTGACACGATGAGGGGGGCACTGCTTGGTGCTGGCATTGCTGG GCTGACACGATGAGGGGGGCACTGCTTGTTGCTGGCATTGCTGG	0 +1T bp +1G bp
Haemi (KS-F-011, Hetero)	GCTGACACGATGAGGGGGGCACTGCTTG TGCTGGCATTGCTGG GCTGACACGATGAGGGGGGCACTGCTTGTTGCTGGCATTGCTGG	0 +1T bp
Alsik (M-008, Homo)	GCTGACACGATGAGGGGGGCACTGCTTGTTGCTGGCATTGCTGG	+1T bp
Alsik C (KS-M-004, Homo)	GCTGACACGATGAGGGGGGCACTGCTTGTTGCTGGCATTGCTGG	+1T bp

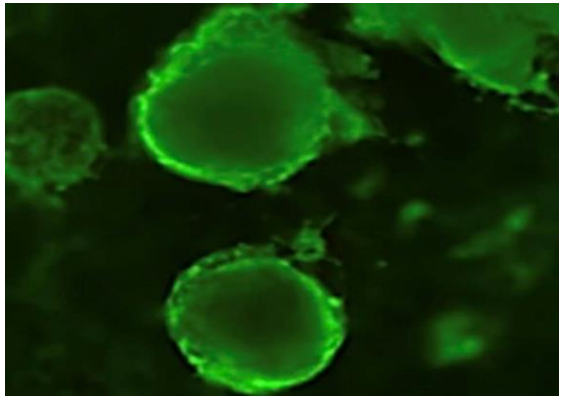
fppt.com

Органоиди









fppt.com