

КРИОКОНСЕРВАЦИЯ НА ПОЛУЧЕНИ ИН ВИТРО ГОВЕЖДИ ЕМБРИОНИ

Янчо Тодоров* Тая Тодорова

Институт по Животновъдни науки – гр. Костинброд

*E-mail: ianchot@abv.bg

РЕЗЮМЕ

С цел да се сравни степента на преживяване на ембриони от говеда, замразени с различни протоколи, ооцити, получени от яйчници в кланици, бяха използвани за ин витро матурация (IVM), ин витро оплождане (IVF) и ко-култивиране. Експандираните бластоцисти бяха криоконсервирани чрез бавно замразяване с $0,3\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$ и витрификация с етиленгликол и захароза (ES). След размразяването ембрионите бяха ко-култивирани върху монослой от гранулозни клетки и оценени след 24 часа за ре-експанзия. На 24, 48, 72 и 96 час бяха определени степените на развитие и излюпване. Степента на ин витро оцеляване (излюпване на 96 часа) на ембриони, замразени чрез бавно замразяване, със скорост на охлаждане $0,3\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$ (76,44%), е сходна с тази, получена за контролната група (88,88%, без криоконсервиране). Витрификация с използване на ES показва степени на оцеляване от 18,29%. Резултатите от експериментите показват, че бавното замразяване с $0,3\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$ е най-добрият метод за криоконсервиране на получени ин витро ембриони от говеда.

Ключови думи: говеда, IVF, IVC, криоконсервация, витрификация

CRYOPRESERVATION OF IN VITRO PRODUCED BOVINE EMBRYOS

Yancho Todorov*, Tanya Todorova

Institute of Animal Science – Kostinbrod

*E-mail: ianchot@abv.bg

ABSTRACT

In order to compare the survival rate of bovine embryos frozen by different protocols, oocytes derived from ovaries in slaughterhouses were used for IVM, IVF and IVC. Expanded blastocysts were cryopreserved by slow freezing at $0.3\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$, and vitrification was done using ethylene glycol + sucrose (ES). After thawing, the embryos were co-cultivated on a monolayer of granulosa cells and evaluated after 24 hours for re-expansion. At 24, 48, 72 and 96 hours the stages of development and hatching were determined. The degree of in vitro survival (hatching of 96 hours) of frozen by slow freezing method embryos at a cooling rate of $0.3\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$ (76.44%) was similar to that obtained for the control group (88.8% without cryopreservation). Vitrification using ES showed survival rates of 18.9%. In conclusion, in our hands, the slow freezing with $0.3\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$ was the best method for cryopreservation of in vitro derived bovine embryos.

Key words: cattle, IVF, IVC, cryopreservation, vitrification

С постепенното развитие и прилагане на биотехнологии в репродуктивната медицина, годишно се генерират голям брой ембри-

они, които могат да бъдат трансплантирани, свежи или след замразяване, на синхронизирани реципиенти.

Най-изгодният и лесен вариант за получаване на ембриони ин витро е използването на яйцеклетки, получени от кланичен материал. Чрез тези методи могат да се получават стотици хиляди ембриони годишно. Тъй като е невъзможно всички да бъдат трансплантирани, се налага прилагането на криоконсервация.

Има много изследвания относно разликите в морфологията; цвета; плътността; броя на клетките; чувствителността към температурата; скоростта на развитие; устойчивостта към замразяване; процента на бременностите след трансфер (Greve et al., 1994) и в експресията на специфични, свързани с развитието гени транскрипти (Wrenzycki et al., 2007) при ин витро получени ембриони, в сравнение с ембриони, получени ин vivo.

В началото на 70-те бяха замразени конвенционално първите ембриони (в случая от мишки, Whittingham et al., 1972). Това позволи успешно съхранение на ембриони за неограничен период от време. В същото време при замразяването се появиха нови рискове, например вътреклетъчно образуване на ледени кристали. През 1985 г. Rall and Fahy за първи път прилагат метода на витрификация за успешно криоконсервиране на ембриони, без опасност от образуване на ледени кристали.

И при конвенционалната криоконсервация и при витрификацията се провеждат много изследвания, целящи оптимизиране на методите, например прилагане на различни криопротектори за подобряване на успеха при конвенционално замразяване (Seidel et al., 1990, 2006; Gutiérrez et al., 1993).

През последните години при витрификацията протоколите се промениха много и са постигнати значителни подобрения в процента на оцелелите ембриони след размразяването. В тези насоки се работеше главно за увеличаване на скоростта на охлаждане, например чрез намаляване на обема на пробата (Arav et al., 2002; Yavin et al., 2009). При сравнение между резултатите, например, процентът на оцелелите и бременност след трансфера и при двата метода на морфологично ниво показваха, че към момента витрификацията има потенциал да се превърне в по-добър ме-

тод за криоконсервация на ин витро получени ембриони (Dobrinsky, 2001, 2002; Kuleshova et al., 2001; Kuleshova and Lopata, 2002).

Целта на това изследване беше да се сравни преживяемостта на ин витро получени ембриони, замразени чрез бавно замразяване с 0,3 °C в минута, и витрифицирани ембриони в етиленгликол и захароза (ES).

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ

Химикали и реактиви:

Всички химикали и реактиви са получени от Sigma Chemical (St. Louis, MO, USA). Серумът от крави в еструс (ECS) бе приготвен *in situ* в нашата лаборатория. Като източник на FSH бе използван препаратът Folltropin (Vetoquinol).

Получаване на ооцити:

Общо 1700 ооцити бяха получени от яйчници на заклани крави и транспортирани до лабораторията във фосфатно-буферен физиологичен разтвор (PBS) при 30 °C. След аспирация с игла 21G, кумулусно-ооцитните комплекси (COCs) бяха оставени да се утаят за 10 минути. Селекцията на кумулусно-ооцитните комплекси се извършваше на базата на морфологията, според хомогенността на цитоплазмата и броя на гранулозните клетъчни слоеве (De Loss et al., 1989; Тодорова, Т., 2008).

Ин витро продукция на ембриони:

Процедурите и средите за ин витро матуриране, оплождане и култивиране на говежди ооцити се извършваха по методите, разработени в нашата лаборатория (Тодорова, Т., 2007). Матурацията се извършваше в МРМ (Модифициран Паркър медиум) с добавка на 20% декомплементиран естрален серум (ECS) и 2 µg/ml фоликулостимулиращ хормон (FSH).

При оплождането е използвана модифицирана Tyrode's лактат среда. Семенната течност от бици е дълбоко замразена в пайети. Оплождането на матурираните ооцити се извършваше в малки петриеви панички. Стадите на делене и развитие до бластоцист бяха отчетени 48 часа след оплождането и през

следващите седем до девет дни от култивирането. Експандираните бластоцисти на 7, 8 и 9 ден бяха разпределени на случаен принцип между групите. Незамразените ембриони служеха за контролна група.

Криоконсервация:

Бавно замразяване при 0,3 °C/min

Експандираните бластоцисти се прехвърляха в 10% разтвор на етилен гликол (EG) в PBS, зареждаха се в 0,25 ml пайети при стайна температура (24 °C) за около 10 мин. Порции от 85 µl PBS + 0,3 M разтвор на захароза бяха засмуквани в краищата на пайетата. Пайетите се поставяха в алкохолна баня на програмируем фризер (PG20, HAASKE, Germany) при 7 °C за десет минути и се извършваше посявка на кристал (сийдинг) чрез докосване на пайетата с охладена в течен азот пинсета. След това пайетите се охлаждаха от 7 до 45 °C при скорост от 0,3 °C/min. След достигане на целевата крайна температура от 45 °C, пайетите бяха прехвърлени в течен азот.

Витрификация в ES:

Експандираните бластоцисти бяха еквилибрирани в разтворите за криоконсервация в три стъпки при стайна температура. Първо, ембрионите бяха поставени в 10% разтвор на EG в PBS, в продължение на 5 мин., и след това поставени в разтвор на 25% EG в PBS за още 5 мин. След това ембрионите са прехвърлени в 40% етилен гликол + 0,3 M захароза в PBS (ES), в продължение на 30 секунди, зареждат се в 0,25 ml пайети и се потапят директно в течен азот.

Размразяване и отстраняване на криопротектора:

Размразяването се осъществява чрез задържане на замразената пайета за 10 секунди при стайна температура и 10 секунди в 25 °C водна баня. Съдържанието на пайетата беше изпразнено в петриева паничка и ембрионите бяха прехвърлени в 0,3 M разтвор на захароза в PBS, в продължение на 5 минути, и след това в изотоничен PBS за рехидратиране в продължение на 4–5 минути. Ембрионите се

промиват два или три пъти и се прехвърлят в среда за култивиране MPM + 10% ECS. Реекспанзията и развитието на ембрионите до излюпване се наблюдаваха на 24, 48, 72 и 96 часа след размразяването.

Статистически анализ:

Данните бяха анализирани чрез анализ на най-малките квадрати на варианса, използвайки общите линейни модели (GLM) на SAS (1989). Пайетата беше отчитана като експериментална единица. Процентните данни бяха трансформирани чрез арксин трансформация преди анализа, за да се отговори на предположенията за нормалност и хомогенност на вариантите. Математическият модел включваше главните ефекти и всички взаимодействия. Всички основни ефекти се приемаха за фиксирани. Независими променливи бяха третиранията и повторенията, а зависимите променливи бяха процент на експандираните и процент на излюпените бластоцисти.

Ортогонални контрасти и средна процедура на разделяне от SAS, наречени pdiff, бяха приложени при подходящи условия, за да се определят разликите между отделните нива на индивидуалните третирания. $P < 0,05$ се приемаше за достоверно.

РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

След култивиране в продължение на 24 часа ембрионите, замразени със стандартната процедура, се развиваха по-добре от витрифицираните в ES ($P < 0,05$). При процента на излюпване след 48 и 72 часа култивиране се наблюдаваше същата тенденция. Данните са показани в табл. 1.

Процентът на излюпени бластоцисти след 96 часа култивиране не се различаваше достоверно при конвенционално замразяване и витрифициране в ES. Процентът на излюпени бластоцисти след 96 часа култивиране не се различаваше между незамразени ембриони (контролна група), замразените чрез конвенционалната процедура с 0,3 °C/min. Резултатите са отразени в табл. 2.

Таблица 1. Експандирани и излюпени бластоцисти 24, 48 и 72 h след размразяване и ин витро култивиране (mean \pm SEM)

Table 1. Expanded and hatched blastocysts 24, 48 and 72 h. after thawing and in vitro culture (mean \pm SEM)

Групи / Group	IVC (n)	Експандирани / Expanded, % (n)	24 h Излюпени / Hatched, % (n)	48 h Излюпени / Hatched, % (n)	72 h Излюпени / Hatched, % (n)
Бавно замразяване / Slow freezing (0,3 °C/min)	159	53,98 \pm 8,67 ^c (78)	44,00 \pm 5,98 ^a (35)	56,26 \pm 6,90 ^a (55)	69,57 \pm 7,62 ^a (68)
Витрификация / Vitrification ES	177	22,62 \pm 8,11 ^a (31)	12,11 \pm 5,56 ^d (3)	14,37 \pm 6,46 ^b (8)	17,27 \pm 7,12 ^b (12)

^{abcd} Различните букви показват достоверни разлики ($P < 0,05$)

^{abcd} Different superscript letters denote statistical difference ($P < 0.05$)

Таблица 2. Излюпени бластоцисти след размразяване и култивиране ин витро за 96 часа

Table 2. Hatched blastocysts after thawing and in vitro culture for 96 h

Групи / Group	Бластоцист (n) / Blastocyst	96 h
Бавно замразяване / Slow freezing (0,3 °C/min)	81/159	76,44 \pm 9,46 ^a
Витрификация / Vitrification ES	20/177	18,29 \pm 8,91 ^c
Контролна група / Control	124/179	88,88 \pm 7,29 ^a

^{abcd} Различните букви показват достоверни разлики ($P < 0,05$)

^{abcd} Different superscript letters denote statistical difference ($P < 0.05$)

Karlsson et al. (1996) описва, че вътрешноклетъчното образуване на лед е свързано със скоростта на охлаждане, температурата и концентрацията на криопротектора. Бавното охлаждане не замразява цитоплазмата на ембриона, защото остава в равновесие с нарастващата концентрация на екстрацелуларен разтвор (Mazur, 1990). Според нашите резултати, концентрацията на криопротектора бе ефикасна за защита на голям брой ембриони срещу увреждания при протокола на бавно замразяване.

Степените на излюпване на бластоцистите след витрифициране в ES бяха по-ниски, в сравнение със степените, получени при конвенционално замразяване. Витрификацията неминуемо води до увреждане на ембрионалните клетки. Говеждите ембриони, получени ин витро след витрификация, обикновено стават изключително уязвими към криоувреждане, поради вътреклетъчни и мембранни дефекти, причинени от обмен на вода и криопротективни агенти между вътреклетъчната и извънклетъчната среда (Pugh et al., 2000).

Промени, дължащи се на витрификацията, вече са описвани и са свързани със структурно увреждане (Vajta et al., 1997), загуба на функция на мембранните рецептори (Когучи et al., 2004), слаба активност на Na/H помпа и HCO₃⁻/Cl⁻ – обменника и щети в целостта на клетъчните мембрани и междуклетъчни органели (Lane et al., 2000).

Протоколите за витрификация изискват по-високи концентрации на криопротектори, които могат да подложат ембрионите на осмотични и токсични ефекти. Тези ефекти могат да бъдат преодолені чрез използването на по-подходящи криозащитни средства, като EG, или комбинирането на две или повече криозащитни средства (Massip, 2001).

ИЗВОДИ

Резултатите от проучването показват, че ин витро получените експандирани бластоцисти на 7, 8 и 9 дни от ин витро култиви-

рането могат да бъдат ефективно замразени чрез бавно замразяване в EG и витрификация в ES, разтворен в PBS.

По-високите нива на преживяемост на ембрионите след размразяването при нашите експерименти показват, че бавното замразяване с 0,3 °C/min бе най-добрият метод за криоконсервиране на получени ин витро говежди ембриони.

ЛИТЕРАТУРА

- Тодорова, Т.** (2007). Ин витро матуриране, оплождане и култивиране на говежди ооцити, влияние на изкуствени методи за активация на ооцитите. Дисертация.
- Тодорова, Т.** (2008). Витрификация на in vitro получени ембриони от говеда. *Животновъдни науки*, XLV, 6, 52-56.
- Arav, A., Yavin, S., Zeron, Y., Natan, D., Dekel, I., & Gacitua, H.** (2002). New trends in gamete's cryopreservation. *Molecular and cellular endocrinology*, 187(1-2), 77-81.
- Dobrinsky, J. R.** (2001). Cryopreservation of pig embryos: adaptation of vitrification technology for embryo transfer. *Reproduction (Cambridge, England) Supplement*, 58, 325-333.
- Dobrinsky, J. R.** (2002). Advancements in cryopreservation of domestic animal embryos. *Theriogenology*, 57(1), 285-302.
- De Loos, F., Van Vliet, C., van Maurik, P. V., & Kruip, T. A.** (1989). Morphology of immature bovine oocytes. *Molecular Reproduction and Development*, 24(2), 197-204.
- Gilchrist, R. B., Zeng, H. T., Wang, X., Richani, D., Smitz, J., & Thompson, J. G.** (2015). Reevaluation and evolution of the simulated physiological oocyte maturation system. *Theriogenology*, 84(4), 656-657.
- Greve, T., H. Callesen, Hyttel, P., Avery, B.** (1994). From oocyte to calf: in vivo and in vitro. *Animal Production and Biotechnology*. G. F. Greppiu. G. Enne. Paris, Elsevier Biofutur: 71-91.
- Gutierrez, A., Garde, J., Artiga, C. G., Munoz, I., & Pintado, B.** (1993). In vitro survival of murine morulae after quick freezing in the presence of chemically defined macromolecules and different cryoprotectants. *Theriogenology*, 39(5), 1111-1120.
- Karlsson, J. O., Eroglu, A., Toth, T. L., Cravalho, E. G., & Toner, M.** (1996). Fertilization and development of mouse oocytes cryopreserved using a theoretically optimized protocol. *Human Reproduction*, 11(6), 1296-1305.
- Koruji, S. M., Movahedin, M., & Rezazadeh Valojerdi, M.** (2004). Assessment of Epidermal Growth Factor (EGF) Effects on Development of Vitrified Mouse Morulae to the Blastocyst Stage. *Iranian Biomedical Journal*, 8(2), 77-82.
- Kuleshova, L. L., Shaw, J. M., & Trounson, A. O.** (2001). Studies on replacing most of the penetrating cryoprotectant by polymers for embryo cryopreservation. *Cryobiology*, 43(1), 21-31.
- Kuleshova, L. L., & Lopata, A.** (2002). Vitrification can be more favorable than slow cooling. *Fertility and sterility*, 78(3), 449-454.
- Lane, M., Lyons, E. A., & Bavister, B. D.** (2000). Cryopreservation reduces the ability of hamster 2-cell embryos to regulate intracellular pH. *Human Reproduction*, 15(2), 389-394.
- Mazur, P.** (1990). Equilibrium, quasi-equilibrium, and nonequilibrium freezing of mammalian embryos. *Cell biophysics*, 17(1), 53-92.
- Massip, A.** (2001). Cryopreservation of embryos of farm animals. *Reproduction in Domestic Animals*, 36(2), 49-55.
- Pugh, P. A., Tervit, H. R., & Niemann, H.** (2000). Effects of vitrification medium composition on the survival of bovine in vitro produced embryos, following in straw-dilution, in vitro and in vivo following transfer. *Animal reproduction science*, 58(1-2), 9-22.
- Rall, W. F., & Fahy, G. M.** (1985). Ice-free cryopreservation of mouse embryos at -196 °C by vitrification. *Nature*, 313(6003), 573.
- Seidel, G. E., Elsdon, R. P., & Brink, Z.** (1990). Cryopreservation of bovine embryos in media with chemically defined macromolecules. *Theriogenology*, 33(1), 322.
- Seidel, G. E., & Walker, D. J.** (2006). Pregnancy rates with embryos vitrified in 0.25-mL straws. *J. Reprod. Dev.*, 52, S71-S76.
- Vajta, G., Booth, P. J., Holm, P., Greve, T., & Calleson, H.** (1997). Successful vitrification of early stage bovine in vitro produced embryos with the open pulled straw (OPS) method.
- Wrenzycki, C., Herrmann, D., & Niemann, H.** (2007). Messenger RNA in oocytes and embryos in relation to embryo viability. *Theriogenology*, 68, S77-S83.
- Whittingham, D.G., Leibo, S.P., Mazur, P.** (1972). Survival of mouse embryos frozen to -196 °C and -269 °C. *Science*;178:411-414.
- Yavin, S., Aroyo, A., Roth, Z., & Arav, A.** (2009). Embryo cryopreservation in the presence of low concentration of vitrification solution with sealed pulled straws in liquid nitrogen slush. *Human Reproduction*, 24(4), 797-804.