

PRZEŻYwalNOŚĆ ZARODKÓw KRÓLICZYCH WITRYFIKOWANYCH METODĄ RAPID-I*

Karolina Fryc¹, Aleksandra Bieryt², Barbara Kij², Anna Migdał²,
Agnieszka Nowak³, Maciej Murawski¹, Joanna Kochan²

¹Uniwersytet Rolniczy w Krakowie, Katedra Biotechnologii Zwierząt, ul. Rzędzina 1B,
30-248 Kraków

²Uniwersytet Rolniczy w Krakowie, Instytut Nauk Weterynaryjnych, al. Mickiewicza 24/28,
30-159 Kraków

³Centrum Medycyny Rozrodu ARTVIMED, ul. Legendy 3, 30-147 Kraków

*W ostatnich latach nastąpił szybki rozwój nowoczesnych technik wspomaganego rozrodu. Na szczególną uwagę zasługuje możliwość przechowywania gamet i zarodków w stanie zamrożonym przez niemal nieograniczony czas. Niestety zarodki po kriokonserwacji cechują się słabszymi kompetencjami rozwojowymi niż zarodki niepoddane temu zabiegowi. Badanie miało na celu określenie stopnia przeżywalności zarodków króliczych witryfikowanych metodą Rapid-I. Pozyskane poubojowo zarodki podzielono na grupy doświadczalną i kontrolną. Grupy kontrolną i badawczą hodowano *in vitro* łącznie przez 7 dni. Zarodki z grupy badawczej witryfikowano po 48 godzinach od rozpoczęcia hodowli *in vitro*. Przeżywalność blastomerów oceniono na podstawie wyniku barwienia zarodków mieszaniną jodku propidyny i fluoresceiny. Badania wykazały wyższą śmiertelność blastomerów (27%) zarodków króliczych witryfikowanych w porównaniu z zarodkami niepoddanymi witryfikacji (11,8%).*

Słowa kluczowe: witryfikacja, zarodki królicze, Rapid-I, kriokonserwacja

Kriokonserwacja gamet i zarodków jest jedną z podstawowych technik wspomaganego rozrodu, umożliwiających tworzenie biobanków służących do przechowywania materiału genetycznego zwierząt hodowlanych i dziko żyjących zagrożonych wyginięciem (Vajta, 2000; Silber i in., 2013). Ponadto kriokonserwacja zarodków jest powszechnie stosowaną procedurą biomedyczną w klinikach leczenia niepłodności ludzi w programach zapłodnienia *in vitro* (Pereira i Rosenwaks, 2016).

*Praca finansowana z UR Kraków, DS 3208.

Witryfikację stosuje się do kriokonserwacji oocytów i zarodków we wszystkich stadiach rozwojowych u wielu gatunków zwierząt (Herrero i in., 2011; Mandawala i in., 2016). Po raz pierwszy metoda ta została wykorzystana do zarodków ssaków w 1985 roku jako prosty i tani sposób na kriokonserwację materiału biologicznego, umożliwiający zamrażanie bez tworzenia się kryształków lodu (Rall i Fahy, 1985). Początkowo do witryfikacji stosowano roztwory krioprotektantów w dużych objętościach w słomkach o pojemności 0,25 ml. Współcześnie w metodach witryfikacji, takich jak CryoTop, Cryoloop czy Rapid-I, stosuje się niewielkie objętości mieszanin witryfikacyjnych nieprzekraczających kilku μl . Dzięki temu skraca się do minimum czas trwania procesu zeszklenia, co znacząco ogranicza uszkodzenia zamrażanych zarodków, a po ich rozmrożeniu umożliwia im natychmiastowe wznowienie przemian metabolicznych (Bagis i in., 2005). Pomimo to każda taka ingerencja i manipulacja na zarodkach może niekorzystnie wpłynąć na kompetencje rozwojowe oraz późniejszy wzrost zarodka i płodu (Zernicka-Goerz i in., 2009).

Królik domowy ze względu na swoją wysoką plenność, dobrą płodność, prowadzoną owulację oraz wysoką efektywność pozaustrojowej produkcji zarodków jest przydatnym modelem w badaniach z zakresu embriologii eksperymentalnej zwierząt i ludzi. Ma to szczególne znaczenie w świetle licznych kontrowersji etycznych dotyczących badań na zarodkach ludzkich. Dlatego też wszystkie procedury stosowane w programach zapłodnienia *in vitro* u ludzi są wcześniej testowane i udoskonalane na gametach i zarodkach zwierząt.

Celem przeprowadzonych badań było określenie przeżywalności zarodków króliczych poddanych witryfikacji metodą Rapid I.

Material i metody

Doświadczenie zostało przeprowadzone na zarodkach króliczych pozyskanych poubojowo. Dawczyniami zarodków były trzy królice rzeźne rasy popielniańskiej białej, niepoddane stymulacji hormonalnej, o masie od 3,8 do 4,3 kg. Dobę przed ubojem i pozyskaniem zarodków samice pokryto samcem tej samej rasy.

Pozyskiwanie zarodków

Zarodki pozyskano, przepłukując jajowody królic. Do lejka jajowodu wprowadzono kateter, a do rogu macicy płyn fizjologiczny i przepłukiwano jajowód. Zarodki wyszukiwano pod mikroskopem stereoskopowym, a następnie oceniano ich stadium rozwojowe.

Hodowla *in vitro* zarodków

Wyflukane zarodki podzielono na dwie grupy. Grupy kontrolną i badawczą hodowano *in vitro* łącznie przez 7 dni. Zarodki z grupy badawczej witryfikowano po 48 godzinach od rozpoczęcia hodowli *in vitro*. Po rozmrożeniu zarodki ponownie umieszczano w hodowli *in vitro* na kolejne 5 dni, w celu określenia ich kompetencji rozwojowych.

Hodowlę zarodków prowadzono *in vitro* w pożywce TCM 199 z dodatkiem 10% FBS, 4 mg/ml pirogronianu i 16 mg/ml L-glutaminy w temperaturze 38°C, w atmosferze z dodatkiem 5% CO₂.

Witrifikacja

Przed witrifikacją metodą Rapid I zarodki ekwilibrowano w 20% roztworze glikolu etylowego w pożywce TCM 199 przez 10 minut w temperaturze pokojowej. Następnie przenoszono je do mieszaniny witrifikacyjnej zawierającej 40% glikolu etylowego, 18% ficollu i 0,3 M sacharozy. Następnie po 30 sekundach zarodki umieszczano pojedynczo na poliwinylowej bagietce, na którą nasuwano cylindryczną osłonkę, po czym zanurzano ją w ciekłym azocie (-196°C).

Zarodki rozmrażano w powietrzu w temperaturze pokojowej, wyjmując bagietkę z ciekłego azotu. Rozmrożone zarodki umieszczano w kropli 0,3 M roztworu sacharozy, a następnie przenoszono je do pożywki TCM 199 z dodatkiem 10% FBS, 4 mg/ml pirogronianu i 16 mg/ml L-glutaminy. Zarodki hodowano przez 5 dni w temperaturze 38°C *in vitro*, w celu oceny zdolności rozwojowych.

Ocena żywotności zarodków

Ocenę żywotności blastomerów w zarodkach przeprowadzono na podstawie barwienia różnicowego, stosując mieszaninę barwników fluorescencyjnych jodku propidyny i dioctanu fluoresceiny rozpuszczonych w DPBS w ilości odpowiednio 0,05 mg/ml i 0,005 mg/ml. Wybarwione zarodki poddano ocenie pod mikroskopem fluorescencyjnym. Blastomery w zarodkach wykazujące czerwoną fluorescencję oceniano jako martwe, a świecące na zielono jako żywe.

Wyniki

Od trzech królic pozyskano 19 zarodków, z których 15 było zygotami, a 4 zarodkami 2-blastomerowymi. Pozyskane zarodki podzielono na grupy doświadczalną i kontrolną, w których znajdowało się odpowiednio 12 i 7 zarodków. Grupę doświadczalną zarodków poddano procesowi witrifikacji, natomiast kontrolną hodowano przez 7 dni *in vitro*.

Z 12 zarodków poddanych witrifikacji po rozmrożeniu 2 (16,6%) osiągnęły stadium blastocysty, natomiast w grupie kontrolnej do stadium blastocysty rozwinęło się 5 (71,8%) zarodków.

Barwienie różnicowe zarodków mieszaniną barwników fluorescencyjnych wykazało, że w grupie kontrolnej odnotowano średnio 11,8% martwych blastomerów (tab. 2), natomiast w grupie doświadczalnej obserwowano ponad dwukrotnie wyższą liczbę obumarłych blastomerów wynoszącą 27%.

Tabela 1. Rozwój i żywotność zarodków króliczych hodowanych *in vitro* przez 5 dni po wtryfikacji
 Table 1. Development and viability of rabbit embryos cultured *in vitro* for 5 days following vitrification

Numer zarodka Embryo number	Stadium rozwojowe po wpytkaniu z jajowodu Development stage after flushing from the oviduct	Stadium rozwoju zarodków po wtryfikacji Development stage of vitrified embryos	Stadium rozwoju zarodków po rozmrożeniu i hodowli <i>in vitro</i> Embryo development stage after thawing and <i>in vitro</i> culture	Liczba blastomerów Number of blastomeres	Liczba żywych blastomerów n (%) Number of live blastomeres n (%)	Liczba nekrotycznych blastomerów n (%) Number of necrotic blastomeres n (%)
1	zygota zygote	4 blastomery 4 blastomeres	4 blastomery 4 blastomeres	4	2 (50%)	2 (50%)
2	zygota zygote	4 blastomery 4 blastomeres	8 blastomerów 8 blastomeres	8	2 (25%)	6 (75%)
3	zygota zygote	6 blastomerów 6 blastomeres	8 blastomerów 8 blastomeres	8	6 (75%)	2 (25%)
4	zygota zygote	4 blastomery 4 blastomeres	10 blastomerów 10 blastomeres	10	6 (60%)	4 (40%)
5	zygota zygote	4 blastomery 4 blastomeres	12 blastomerów 12 blastomeres	12	7 (58,3%)	5 (41,7%)
6	zygota zygote	7 blastomerów 7 blastomeres	14 blastomerów 14 blastomeres	14	12 (85,7%)	2 (14,3%)
7	zygota zygote	4 blastomery 4 blastomeres	16 blastomerów 16 blastomeres	16	12 (75%)	4 (25%)
8	zygota zygote	4 blastomery 4 blastomeres	Morula	19	12 (63,2%)	7 (36,8%)
9	zygota zygote	3 blastomery 3 blastomeres	Morula	27	20 (74,1%)	7 (25,9%)
10	zygota zygote	6 blastomerów 6 blastomeres	Morula	28	22 (78,6%)	6 (21,4%)
11	zygota zygote	4 blastomery 4 blastomeres	Blastocysta Blastocyst	53	36 (67,9%)	17 (32,1%)
12	zygota zygote	6 blastomerów 6 blastomeres	Blastocysta Blastocyst	66	50 (75,8%)	16 (24,2%)
				$\bar{x}=22 \pm 18,53$	$\bar{x}=16 (73\%)$	$\bar{x}=6 (27\%)$

Tabela 2. Rozwój i żywotność zarodków króliczych niepoddanych witrifikacji hodowanych przez 5 dni *in vitro*
 Table 2. Development and viability of non-vitrified rabbit embryos cultured for 5 days *in vitro*

Numer zarodka Embryo number	Stadium rozwoju zarodków po wypłukaniu z jajowodu Embryo development stage after flushing from the oviduct	Stadium rozwoju zarodków po 5 dniach hodowli <i>in vitro</i> Embryo development stage after 5-day <i>in vitro</i> culture	Liczba blastomerów Number of blastomeres	Liczba żywych blastomerów n (%) Number of live blastomeres n (%)	Liczba nekrotycznych blastomerów n (%) Number of necrotic blastomeres n (%)
1	zygota zygote	8 blastomerów 8 blastomeres	8	8 (100%)	0
2	zygota zygote	morula	26	23 (88,5%)	3 (11,5%)
3	zygota zygote	blastocysta blastocyst	48	40 (83,3%)	8 (16,7%)
4	2 blastomery 2 blastomeres	blastocysta blastocyst	57	50 (87,7%)	7 (12,3%)
5	2 blastomery 2 blastomeres	blastocysta blastocyst	67	66 (98,5%)	1 (1,5%)
6	2 blastomery 2 blastomeres	blastocysta blastocyst	72	66 (91,6%)	8 (8,4%)
7	2 blastomery 2 blastomeres	blastocysta blastocyst	78	64 (82%)	14 (18%)
			$\bar{x}=51 \pm 28,35$	$\bar{x}=45 (88,2\%)$	$\bar{x}=6 (11,8\%)$

Omówienie wyników

Istotą kriokonserwacji jest zatrzymanie w gametach i zarodkach procesów metabolicznych, co umożliwia ich przechowywanie praktycznie przez nieograniczony czas. Niestety proces ten wpływa niekorzystnie na parametry morfologiczne i zdolności rozwojowe zarodków po rozmrożeniu.

Dotychczas zarodki i oocyty zamrażano we freezerach, które umożliwiają kontrolowanie tempa obniżania temperatury i bezpostaciowego zestalania się schładzanego płynu. Wewnątrzkomórkowa krystalizacja wody, jak i pozostałe czynniki stresogenne mogą być przyczyną uszkodzeń blastomerów w trakcie zamrażania oraz wpływać na ich zamieralność i kompetencje rozwojowe po rozmrożeniu, a także nieprawidłowy rozwój płodu, jego obumarcie oraz zaburzenia rozwojowe w okresie postnatalnym (Kasai i Mukaida, 2004, Saenz-de-Juano i in., 2016; Pluess i Belsky, 2011).

Współcześnie do kriokonserwacji gamet i zarodków coraz częściej stosuje się metodę wityfikacji, która polega na ultraszybkim zeszkleniu zmrażanego materiału biologicznego. Procesy metaboliczne w zarodku podczas wityfikacji są gwałtownie zatrzymywane, towarzyszy temu również mniejsze uszkodzenie blastomerów, przez co ich przeżywalność jest znacząco wyższa w porównaniu z metodą powolnego zamrażania (Meikle i in., 2018). Potwierdzeniem lepszej skuteczności wityfikacji od zamrażania poprzez powolne schładzanie może być przykład badania przeprowadzonego na ludzkich zarodkach przez Loutradi i in. (2008), które wykazało zwiększoną przeżywalność blastocyst po wityfikacji niż po powolnym zamrażaniu (Loutradi i in., 2008).

Przeprowadzone badania własne wykazały, iż kompetencje rozwojowe zarodków króliczych poddanych wityfikacji obniżyły się ponad czterokrotnie w porównaniu z grupą kontrolną. Zarodki poddane wityfikacji charakteryzowały się niemal trzykrotnie większą obecnością martwych blastomerów. Przyczyną słabej przeżywalności zarodków króliczych po wityfikacji w naszych badaniach może być ich wczesne, kilkublastomerowe stadium rozwoju. Uważa się, że zarodki, które osiągnęły stadium blastocysty, najlepiej nadają się do procedury kriokonserwacji (Papis i Koziół, 2012).

Przeprowadzone przez zespół Hashimoto i in. (2013) badania wityfikowanych zarodków ludzkich wykazały około 31% śmiertelność blastomerów, co jest zbliżonym wynikiem uzyskanym w naszych badaniach wityfikowanych zarodków króliczych – wynoszącym średnio 27%. Natomiast w przypadku udziału żywych blastomerów w zarodkach ludzkich niepoddanych wityfikacji Hashimoto i in. (2013) zaobserwowali znacznie niższy wynik, czyli około 32% – niż my w naszych badaniach na zarodkach króliczych – wynoszący aż 88,2%.

Wiele badań przeprowadzonych na zarodkach królików wykazało, że proces wityfikacji wpływa negatywnie na proces gastrulacji oraz ekspresję genów, a także na występowanie zaburzeń proteomicznych w tkankach łożyska, co ma wpływ na śmiertelność płodów i ich niską wagę urodzeniową (Mocé i in., 2010; Vicente i in., 2013; Saenz-De-Juano i in., 2014, 2015). Główną przyczyną powstawania tych zaburzeń jest wysoka koncentracja krioprotektantów w mieszaninie wityfikacyjnej, które są jednocześnie toksyczne dla zarodków. Także badania wykonane przez Lavare i in.

wykazały, iż witrifikacja zarodków króliczych ma długoterminowy wpływ na postnatalny rozwój osobniczy. Zaobserwowali, że płody uzyskane z zarodków po witrifikacji i transferze do samic posiadają zmniejszoną masę wątroby, nerek, serca, płuc i śledziony, w porównaniu do zarodków transferowanych, ale niepoddanych witrifikacji (Lavara i in., 2015).

W przeprowadzonych badaniach własnych u zarodków królika poddanych procedurom witrifikacji i rozmrożenia stwierdzono znacząco wyższy odsetek uszkodzonych blastomerów w porównaniu do zarodków niewitrifikowanych z grupy kontrolnej. Skutkiem obniżonej jakości witrifikowanych zarodków było ograniczenie ich potencjału rozwojowego.

Doskonalenie metod witrifikacji zarodków pozwoli na stworzenie optymalnych protokołów mogących mieć zastosowanie w kriokonserwacji zarodków na wszystkich etapach rozwoju, co ma ogromnie ważne znaczenie zarówno dla hodowli zwierząt, ochrony zasobów genetycznych ginących gatunków, jak również dla embriologii ludzkiej.

Piśmiennictwo

- Bagis H., Mercan H.O., Cetin S., Sekmen S. (2005). The effect of equilibration time on survival and development rates of mouse pronuclear-stage embryos vitrified in solid surface (SSV) and conventional straws: *in vitro* and *in vivo* evaluations. *Mol. Reprod. Dev.*, 72: 494–501.
- Hashimoto S., Amo A., Hama S., Ohsumi K., Nakaoka Y., Morimoto Y. (2013). A closed system supports the developmental competence of human embryos after vitrification. *J. Assist. Reprod. Genet.*, 30 (3): 371–376.
- Herrero L., Martinez M., Garcia-Velasco J.A. (2011). Current status of human oocyte and embryo cryopreservation. *Curr. Opin. Obstet. Gynecol.*, 23: 245–250.
- Kasai M., Mukaida T. (2004). Cryopreservation of animal and human embryos. *Reprod. Biomed. Online*, 9, 2: 164–170.
- Lavara R., Baselga M., Marco-Jiménez F., Vicente J.S. (2015). Embryo vitrification in rabbits: Consequences for progeny growth. *Theriogenology*, 84 (5): 674–680.
- Loutradi K.E., Kolibianakis E.M., Venetis C.A., Papanikolaou E.G., Pados G., Bontis I., Tarlatzis B.C. (2008). Cryopreservation of human embryos by vitrification or slow freezing: a systematic review and meta-analysis. *Fertility and Sterility*, 90 (1): 186–193.
- Mandawala A.A., Harveya S.C., Royb T.K., Fowler K.E. (2016). Cryopreservation of animal oocytes and embryos: Current progress and future prospects. *Theriogenology*, 86: 1637–1644.
- Meikle M.N., Schlappa G., Menchacab A., Crispo M. (2018). Minimum volume Spatula MVD vitrification method improves embryo survival compared to traditional slow freezing, both for *in vivo* and *in vitro* produced mice embryos. *Cryobiology*, 84: 77–81.
- Mocé M.L., Blasco A., Santacreu M.A. (2010). *In vivo* development of vitrified rabbit embryos: effects on prenatal survival and placental development. *Theriogenology*, 73 (5): 704–710.
- Papis K., Kozioł K. (2012). Kriokonserwacja zarodków – niezbędny element procedury zapłodnienia pozaustrojowego. *ART. Newsletter*, 2: 20–25.
- Pereira N., Rosenwak Z. (2016). A fresh(er) perspective on frozen embryo transfers. *Fertility and Sterility*, 106 (2): 257–258.
- Pluess M., Belsky J. (2011). Prenatal programming of postnatal plasticity? *Dev. Psychopathol.*, 23 (1): 29–38.
- Rall W.F., Fahy G.M. (1985). Ice-free cryopreservation of mouse embryos at -196°C by vitrification. *Nature*, 313: 573–575.
- Saenz-de-Juano M.D., Marco-Jimenez F., Schmaltz-Panneau B., Jimenez-Trigos E., Viudes-de-Castro M.P., Peñaranda D.S., Jouneau L., Lecardonnell

- J., Lavara R., Naturil-Alfonso C., Duranthon V., Vicente J.S. (2014). Vitrification alters rabbit foetal placenta at transcriptomic and proteomic level. *Reproduction*, 147 (6): 789–801.
- Saenz-de-Juano M.D., Vicente J.S., Hollung K., Marco-Jimenez M. (2015). Effect of embryo vitrification on rabbit foetal placenta proteome during pregnancy. *PLoS One*, 10 (4): 1–15.
- Saenz-de-Juano M.D., Marco-Jiménez F., Vicente J.S. (2016). Embryo transfer manipulation cause gene expression variation in blastocysts that disrupt implantation and offspring rates at birth in rabbit. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.*, 207: 50–55.
- Silber S.J., Barbey N., Lenahan K., Silber D.Z. (2013). Applying clinically proven human techniques for contraception and fertility to endangered species and zoo animals: a review. *J. Zoo. Wildl. Med.*, 44: 111–122.
- Vajta G. (2000). Vitrification of the oocytes and embryos of domestic animals. *Anim. Reprod. Sci.*, 60–61: 357–364.
- Vicente J.S., Saenz-de-Juano M.D., Jiménez-Trigos E., Viudes-de-Castro M.P., Peñaranda D.S., Marco-Jiménez F. (2013). Rabbit morula vitrification reduces early foetal growth and increases losses throughout gestation. *Cryobiology*, 67 (3): 321–326.
- Zernicka-Goerz M., Morris S.A., Bruce A.W. (2009). Making a firm decision: multifaceted regulation of cell fate in the early mouse embryo. *Nat. Rev. Genet.*, 10: 467–477.

Zatwierdzono do druku 11 I 2019

KAROLINA FRYC, ALEKSANDRA BIERYT, BARBARA KIJ, ANNA MIGDAŁ,
AGNIESZKA NOWAK, MACIEJ MURAWSKI, JOANNA KOCHAN

Survival of rabbit embryos vitrified using Rapid-I

SUMMARY

Recent years have witnessed a rapid development in modern methods of assisted reproductive technology (ART). The possibility of almost unlimited time of frozen storage of gametes and embryos is worth pointing out. Unfortunately, embryos usually have lower developmental competences after cryopreservation. The aim of this study was to determine the survival rate of rabbit embryos vitrified using the Rapid-I method. Embryos were collected from slaughtered rabbits and then divided into experimental and control groups. Embryos from experimental group were vitrified using the Rapid-I method and, after thawing, *in vitro* cultured for 5 days. Control group was incubated *in vitro* for 7 days after collection. To assess the viability of blastomeres, embryos were stained with propidium iodide and fluorescein. Our study showed that mortality of blastomeres was higher in vitrified embryos (27%) compared with non-vitrified embryos (11.8%).

Key words: vitrification, rabbit embryos, Rapid-I, cryopreservation