

Embrió mélyhűtés a „Vitroloop” vitrifikációs technikával

Vass Nóra¹ – Klambauer, Philip² –
Jávor András¹ – Keresztes Zsuzsa³ – Cseh Sándor³

¹Debreceni Egyetem Agrár- és Műszaki Tudományok Centruma,
Mezőgazdaságtudományi Kar,

Állattenyésztéstudományi Intézet, Debrecen

²Állatorvos-tudományi Egyetem, Bécs, Ausztria

³Szent István Egyetem Állatorvos-tudományi Kar,
Szülészeti és Szaporodásbiológiai Tanszék és Klinika, Budapest
vassnora@agr.unideb.hu

ÖSSZEFOGLALÁS

A szerzők VLV (vitroloop vitrifikáció; VLV) módszerrel és egy új összetételű, etilén-glikolt (EG) + propilén-glikolt (PG) + Ficoll-t (F) + szacharózt (SZ) tartalmazó védőoldattal történő egér embriók vitrifikációjáról közölnek eredményeket. A vitrifikált embriók csoportja mellett kialakítottak egy fagyasztó és felmelegítő oldatsorokkal kezelt, de nem vitrifikált és egy kontroll embrió csoportot. Közvetlenül a felolvasztás után az embriók minőségét morfológiai bélyegek alapján elbírálva 202 embrió élte túl a fagyasztást (202/218; 92,7%). A 202 vitrifikációt túlélő embrióból 180 fejlődött a blasztociszta stádiumig (180/202; 89,1%). A vitrifikációs és felmelegítő oldatsorokkal kezelt, de nem fagyasztott embriók esetében 86%-os in vitro fejlődési arányt állapítottak meg (65/75). A kezeletlen kontroll embriók csoportjában az embriók 91,4%-a fejlődött expandált blasztocisztává a 48 óráig in vitro tenyésztés alatt (75/82). Eredményeik azt mutatják, hogy a VitroLoop™ technológia és az új összetételű fagyasztó oldat együttes alkalmazásával magas túlélési és in vitro továbbfejlődési aránnyal vitrifikálhatók az osztódási stádiumú egér embriók.

Kulcsszavak: vitrifikáció, egér embriók, vitroloop

SUMMARY

The objective of the study was to vitrify mouse embryos with the cryoloop technology using a new combination of vitrification mediums. Embryos were exposed to a 2-step loading of CPA, ethylene glycol and propylene glycol, before being placed on the surface of a thin film layer formed from the vitrification solution in a small nylon loop. After warming, the CPA was diluted out from the embryos by a 3-step procedure. Our data show that a high percentage of embryos survived (92.7%) vitrification in the mixture of EG and PG combined with cryoloop carrier and developing normally (89.1%) in vitro after thawing.

Keywords: vitrification, mouse embryos, vitroloop

BEVEZETÉS

A tradicionálisnak mondható „lassú mélyhűtés” mellett az embrió mélyhűtés egy másik változata a vitrifikáció, amikor a sejtek jégkristályképződés nélkül fagynak meg. A vitrifikáció a sejtek mélyhűtésének olcsó és egyszerű módja. 1985-ben

Rall és mtsai a sejtek mélyhűtésének teljesen új megközelítéséről közöltek adatokat; egér embriókat vitrifikáltak. A sikeres vitrifikációhoz három alapvető feltételnek kell teljesülnie: 1. a fagyasztóoldatnak nagy mennyiségben kell tartalmaznia intra- és extracelluláris védőanyagok keverékét, 2. a sejteket kis térfogatú oldatban kell mélyhűteni (néhány µl), 3. igen gyors hűtési sebességet kell alkalmazni. A fent említett feltételek teljesülésekor a védőoldat viszkozitása nő, és jégkristály-képződés nélkül szilárdul meg. A módszer alkalmazása nagy körültekintést és kellő gyakorlatot kíván. A hűtési sebesség növelésével csökkenthető a védőanyagok koncentrációja és ezáltal azok toxicitása, valamint az általuk okozható ozmotikus károsodás veszélye. Az utóbbi években a hűtési sebességet sikerült nagymértékben növelni, azáltal, hogy a védőoldat térfogatát csökkentették, ami annak köszönhető, hogy új típusú szállító/hordozó eszközöket fejlesztettek ki (OPS straw: Vajta és mtsai, 1997; Oberstein és mtsai, 2001; flexipet-denuding pipetta: Liebermann és mtsai, 2002; hemi-straw: Kuwayama és Kato, 2000; nejlonháló: Matsumoto és mtsai, 2001; nejlonhurok: Lane és mtsai, 1999; Oberstein és mtsai, 2001; SSV: Dinnyés és mtsai, 2000). Ennek eredményeként az embriók/petesejtek nagyon kis mennyiségű védőoldatban fagyaszthatók.

ANYAG ÉS MÓDSZER

Egér embriók előállítás és in vitro tenyésztése

Nyolc hetes CB6F1 nőstény egereket szuperovuláltattunk 10 NE eCG/PMSG-vel (i.p.), majd 48 óra elteltével (0. nap) az ovulációt és a petesejtek végső érését 10 NE hCG-vel indukáltuk (i.p.). Közvetlenül a hCG kezelés után a nőstény egereket hímeikkel raktuk össze, majd 20-24 órával később kinyertük a zigótákat, amelyeket a mélyhűtésig G1 médiumban (Vitrolife, Svédország), 37,5 °C-on, 6,5% CO₂-vel és maximális páratartalommal a levegőben 48 órán keresztül tenyésztettük. Az embriók mélyhűtését – minőségi bírálatot követően – a 3. napon reggel végeztük. Csak a korának megfelelő fejlettségi stádiumú, morfológiai rendellenességeket nem mutató embriókat (4-8 sejt és korai/kompakt morula) mélyhűtöttük.

Az osztódási stádiumú egér embriók vitrifikációjánál és a felmelegítés után a védőanyagok kivonásánál használt oldatok

Az embriók fagyasztására a RapidVit Cleave™ (Vitrolife, Svédország) oldatsort alkalmaztuk, amely a következő oldatokból áll: alap oldat-gentamicin és humán szérum albumin (VIT1 oldat), egyensúlyos oldat -7,5% EG, 7,5% PG (VIT2 oldat), vitrifikációs oldat -15% EG, 15% PG, 10 mg/ml F 400, 0.65 mol/l SZ (VIT3 oldat).

Az embriók felmelegítésénél a szacharózt csökkenő koncentrációban tartalmazó G-MOPS oldatsort alkalmaztuk. G-MOPS+ 0,65 mol/l SZ (FELM1 oldat), G-MOPS+ 0,25 mol/l SZ (FELM2 oldat), G-MOPS+ 0,125 mol/l SZ (FELM3 oldat), G-MOPS alap oldat (FELM4 oldat) (RapidWarm Cleave™, Svédország). A G1 oldatban való többszörös mosást követően a vitrifikált/ felolvasztott embriók életképességét G1 oldatban történő 48 órás in vitro tenyésztéssel értékeltük.

A VitroLoop™ hordozó rendszer

A VitroLoop™ egy nejlon hurok, ami egy fém póznához van erősítve. A fém tartót a LN₂ hőmérsékletét elviselő speciális műanyag tubus záró kupakjába süllyesztett mágnes korong tartja. A mágnes korong révén a fém póznát és a hozzá erősített nejlon hurkot, egy speciális fém eszközzel, könnyen és biztonságosan csavarással rögzítjük a műanyag tubusban.

Osztódási stádiumú egér embriók mélyhűtése és felmelegítése

Az ún. négy edényes szövettenyésztő tálca (NUNC 4-well plate, NUNC, Dánia) 1-es, 2- es és 3-as edényébe 1 ml-t tettünk az alap-, az egyensúlyos és a vitrifikációs oldatokból. Ezután a tálcát 37 °C-ra előmelegített melegítő asztalra helyeztük, és az embriókkal kapcsolatos munkát folyamatosan ezen a hőmérsékleten végeztük. Fagyasztáskor az embriók a fenntartó oldatban 5-10, az egyensúlyos oldatban 2 percig tartózkodtak. Az egyensúlyos ideje alatt a vitrifikációs oldatból egy 20 µl-es cseppet helyeztünk egy szövettenyésztő petri csészébe. A nejlon hurkot ebbe mártva film réteget képeztünk a hurok szárai között. Két perc elteltével az embriókat áthelyeztük az egyensúlyos oldatból a 20 µl-es cseppbe, ahol max. 30 másodpercet tölthettek, majd egy mikrokapilláris segítségével áthelyeztük őket a nejlonhurokra. Ezután a nejlonhurokot a folyékony nitrogénnel feltöltött tartójába (Nunc Cryovial, Dánia) tettük, majd a tartóval együtt beraktuk a folyékony nitrogéntároló konténerbe.

Az embriók felmelegítésénél a négy edényes szövettenyésztő tálca 1-es, 2-es, 3-as és 4-es edényébe 1-1 ml-t tettünk a felmelegítő oldatokból, majd a tálcát a 37 °C-ra előmelegített melegítő asztalra helyeztük, és az embriókkal kapcsolatos munkát folyamatosan ezen a hőmérsékleten

végeztük. A tartójából kivett VitroLoop™ nejlonhurkot azonnal az 1-es felmelegítő oldatba merítettük kb. 10-20 sec-ra. Ezután az embriókat áthelyeztük a 2-es oldatba 1 percre, majd a 3-as oldatba 2 percre. A 4-es oldatban az embriók 5 percet töltöttek. Végül az embriókat a többszörös mosást követően 48 órán keresztül G1 oldatban 37 °C-on in vitro tenyésztettük és csak azokat az embriókat tekintettük a fagyasztást túlélőknek, amelyek továbbfejlődtek, és a 48 órás in vitro tenyésztés ideje alatt elérték az expandált blasztociszta stádiumot.

Kísérleti elrendezés

A 3. napos osztódási stádiumú embriókat 3 csoportba soroltuk.

Vitrifikált csoport: az embriókat a vitrifikációs oldatsorral történő kezelést követően fagyasztottuk. A 24 órás LN₂-ben történő tárolás után az embriókat felmelegítettük és végigvittük a felmelegítő oldatsoron.

Fagyasztó és felmelegítő oldatsorokkal kezelt, de nem vitrifikált csoport: az embriókat nem vitrifikáltuk, de a vitrifikációs és felmelegítő oldatsorokkal kezeltük.

Kontroll csoport: in vitro tenyésztett kezeletlen kontroll embriók.

Statisztikai elemzés

A csoportok közötti különbség statisztikai elemzését χ négyzet próbával végeztük (StatSoft, Chicago, USA).

EREDMÉNYEK

229 embrió vitrifikációjára került sor, azonban közülük 11-et a felolvasztás után nem találtunk meg (11/229; 4,8%).

A 218 megtalált embrióból az embriók minőségét morfológiai bélyegek alapján megítélve 202 élte túl a fagyasztást (202/218; 92,7%). A 202 túlélő embrió közül 180 fejlődött a blasztociszta stádiumig a felolvasztást követő 48 órás in vitro tenyésztés alatt (180/202; 89,1%).

A vitrifikációs és felmelegítő oldatsorokkal kezelt, de nem fagyasztott embriók esetében az in vitro fejlődési arány 86%-os volt (65/75).

A kezeletlen embriók csoportjában az embriók 91,4%-a fejlődött expandált blasztocisztaivá (75/82).

MEGBESZÉLÉS

Eredményeink azt mutatják, hogy a VitroLoop™ technológia és az új összetételű fagyasztó oldat együttes alkalmazásával magas túlélési és in vitro fejlődési aránnyal vitrifikálhatók az osztódási stádiumú egér embriók.

Számos irodalmi adat támasztja alá a vitrifikáció előnyeit, miszerint lényegesen kisebb stresszt jelent a sejtek számára, mint a hagyományos fagyasztási módszerek (Stachecky és Cohen, 2004; Leibo és mtsai, 1996; Massip, 2001; Tucker és

Liebermann, 2008; Dinnyés és mtsai, 2000; Fahy és Rall, 2008).

A CLV (nejlonhurok) technikát sikeresen alkalmazták humán, hörcsög, egér, szarvasmarha és ló embriók, valamint humán, ló és szarvasmarha petesejtek vitrifikációjára. Lane és mtsai (1999) egér blasztocisztákat vitrifikálva 100%-os in vitro továbbfejlődési arányt figyeltek meg.

Jelen kísérletsorozatban alkalmazott újszerű összetételű oldatsor esetében a DMSO-nak PG-lal történő helyettesítését az indokolta, hogy az utóbbi kevésbé toxikus és régóta eredményesen alkalmazzák a humán embriók lassú fagyasztásánál (Kasai, 2004). A két népszerű krioprotektív anyag hatékonyságát és toxicitását egér embriókon összehasonlítva a

PG esetében a továbbfejlődési arány nagyobbak bizonyult (Nowshari és mtsai, 1995).

Összefoglalva megállapítható, hogy a VitroLoopTM módszer biztonságos, jó hatékonysággal alkalmazható vitrifikációs eljárás.

Az új összetételű vitrifikációs oldat, amelyben a DMSO-t PG helyettesíti, a korábbi védőoldathoz hasonlóan nagy túlélési és továbbfejlődési arányt biztosít. Tudomásunk szerint osztódási stádiumú egér embrióknak az ún. VitroloopTM vitrifikációs fagyasztási technológiával és az új összetételű etilén-glikol-t (EG), propilén-glikolt (PG), Ficoll-t (F) és szacharózt (SZ) tartalmazó védőoldattal történő vitrifikációjáról még nem közöltek adatokat.

IRODALOM

- Dinnyés, A.-Dai, Y.-Jiang, S.-Yang, X. (2000): High developmental rates of vitrified bovine oocytes following parthenogenetic activation, in vitro fertilization and somatic cell nuclear transfer. *Biol. Reprod.*, 20: 1969-1974.
- Fahy, M. G.-Rall, W. F. (2008): Vitrification: an overview. In: *Vitrification in Assisted Reproduction. A user's manual and troubleshooting guide.* Informa Healthcare. Reproductive Medicine and Assisted Reproductive Techniques Series. Informa UK Ltd.
- Kasai, M. (2004): Cryopreservation of animal and human embryos by vitrification. *Reprod. Biomed. Online*, 9: 164-170.
- Kuwayama, M.-Kato, O. (2000): Successful vitrification of human oocytes. *Fertil. and Steril.* 74 (Supplement) S49 Abstract O-127.
- Lane, M.-Forrest, K. T.-Lyons, E. A.-Bavister, B. D. (1999): Live birth following vitrification of hamster embryos using a novel containerless technique. *Theriogenology*, 51: 167.
- Leibo, S. P.-Martino, A.-Kobayashi, S. (1996): Stage-dependent sensitivity of oocytes and embryos to low temperature. *Anim. Reprod. Sci.*, 42: 503-512.
- Liebermann, J.-Tucker, M. J. (2002): Effect of carrier system on the yield of human oocytes and embryos assessed by survival and developmental potential after vitrification. *Reproduction*, 124: 483-489.
- Massip, A. (2001): Cryopreservation of embryos of farm animals. *Reprod. Domest. Anim.* 36: 49-55.
- Matsumoto, H.-Jiang, J. Y.-Tanaka, T.-Sasada, H.-Sato, E. (2001): Vitrification of large quantities of immature bovine oocytes using nylon mesh. *Cryobiology*, 42: 139-144.
- Nowshari, M. A.-Nayudu, P. L.-Hodges, J. K. (1995): Effect of cryoprotectant and their concentration on post-thaw survival and development of rapid frozen-thawed pronuclear stage mouse embryos. *Hum. Reprod.*, 10: 3237-3242.
- Oberstein, N.-O'Donovan, M. K.-Bruemmer, J. E.-Seidel, G. E.-Carnevale, E. M.-Squires, E. L. (2001): Cryopreservation of equine embryos by open pulled straw, cryoloop or conventional slow cooling methods. *Theriogenology*, 55: 607-613.
- Rall, W. F.-Fahy, G. M. (1985): Ice-free cryopreservation of mouse embryos at -196 degree by vitrification. *Nature*, 313: 573-5.
- Stachecki, J. J.-Cohen, J. (2004): An overview of oocyte cryopreservation. *Reprod. Biomed. Online*, 9: 152-163.
- Tucker, M. J.-Liebermann, J. (2008): *Vitrification in Assisted Reproduction. A user's manual and troubleshooting guide.* Informa Healthcare. Reproductive Medicine and Assisted Reproductive Techniques Series. Informa UK Ltd.
- Vajta, G.-Booth, P. J.-Holm, P.-Greve, T.-Callesen, H. (1997): Successful vitrification of early cleavage stage bovine in vitro produced embryos with the open pulled straw (OPS) method. *Cryo-Letters*, 18: 191-195.