

# Kriokonserwacja zarodków klaczy

MARTA BARAŃSKA

Katedra Rozrodu i Anatomii Zwierząt Wydziału Hodowli i Biologii Zwierząt UR, Al. Mickiewicza 24/28, 30-159 Kraków

Barańska M.

## Cryopreservation of equine embryos

### Summary

Cryopreservation is not a routine procedure for the storage of equine embryos. Regardless of the method of cryopreservation, its efficiency in the transplantation of frozen embryos is relatively low. The success of freezing depends on the phase of embryo development, the type and concentration of the cryoprotectant and the freezing method. Equine embryos can be successfully cryopreserved by using conventional, slow-cooling methods or by vitrification, when embryos do not exceed 250  $\mu\text{m}$  in diameter. In bigger equine embryos, changes in tolerance to cryopreservation are observed. These failures may result from the glycoprotein capsule, which appears in later stages of embryo development. New methods of vitrifying embryos in a reduced volume of fluid (2-10  $\mu\text{l}$ ) enable embryos to pass quickly through the critical stage of rapid temperature changes and make it possible to lower the concentration of cryoprotectants in the vitrification mixture. Vitrification is a rapid procedure that requires limited equipment and time. Further research is needed to increase the survival of equine embryos after slow-freezing or vitrification.

**Keywords:** cryopreservation, vitrification, equine embryos

Próby kriokonserwacji zarodków ssaków rozpoczęły się w latach 70. XX wieku. Pierwszy zarodek, który udało się zamrozić, został uzyskany od myszy w 1972 r. (42). Dotychczas opracowano metody kriokonserwacji zarodków dla kilkunastu gatunków zwierząt (9, 21). U koni większość zabiegów na zarodkach wykonywanych jest bezpośrednio po ich pozyskaniu (23) lub po krótkotrwałym przechowaniu w temperaturze 4°C (28). Kriokonserwacja zarodków klaczy stosowana jest sporadycznie, a procent uzyskiwanych ciąży jest często niesatysfakcjonujący. Przeżywalność zarodków klaczy po rozmrożeniu jest niska w porównaniu z innymi gatunkami zwierząt, niezależnie od stosowanych technik kriokonserwacji (10, 36). Istnieje zatem potrzeba usprawnienia metody kriokonserwacji zarodków zwierząt tego gatunku.

Pierwsze ciąży u klaczy po zamrożeniu, rozmrożeniu i transplantacji zarodków uzyskano w 1981 r. (14) i 1982 (1). Ciąże te zakończyły się poronieniami. Jednocześnie pierwsze dwa źrebięta po tradycyjnym mrożeniu zarodków urodziły się w 1982 r. (43). Kolejne ciąży uzyskano w 1985 r. (36). Pomimo stosunkowo niskiej skuteczności transplantacji zamrożonych zarodków liczba prób transferu w każdym roku zwiększa się.

Wpływ na skuteczność kriokonserwacji mają: faza rozwoju zarodka, rodzaj krioprotektora, jego koncentracja i sposób mrożenia.

Powodzenie kriokonserwacji w największym stopniu zależy od wielkości i stadium rozwojowego zarod-

ka (35). Zarodki we wczesnych stadiach lepiej przeżywają proces kriokonserwacji (6, 15, 25, 29), nie stwierdzono jednak znaczącego wpływu rozmiaru zarodka przechowywanego w temperaturze 15-18°C na wyniki transplantacji (11). Niektóre badania sugerują jednak, iż mniejsze zarodki mogą być bardziej podatne na szkodliwe działanie schładzania (26, 27). Zarodki klaczy pojawiają się w macicy około 5,5. dnia po owulacji, w stadium moruli (12), o średnicy 120-150  $\mu\text{m}$ . Zwiększają swoje wymiary prawie dwukrotnie w ciągu doby. Najkorzystniej jest je pozyskiwać 24 godziny po zstąpieniu do macicy, tj. 6,5-7 dni po owulacji (38). Zarodki o średnicy większej niż 250  $\mu\text{m}$  wykazują zmiany w tolerancji na kriokonserwację, niezauważalne w przypadku zarodków bydłowych (29). Cechą charakterystyczną zarodków klaczy jest glikoproteinowa kapsuła, która obniża tolerancję na kriokonserwację (4, 10). Powstaje 8. dnia po owulacji pod osłonką przejrzystą i przypuszcza się, że utrudnia penetrację krioprotektora do wnętrza komórek zarodka, jak również jego usunięcie z komórek (3, 13, 22, 36). Strumień krioprotektora skierowany na powierzchnię zarodka klaczy może zahamować lub drastycznie obniżyć jego rozwój (31). Hoshi (16) jednak z powodzeniem zamroził zarodki o średnicy 300  $\mu\text{m}$ , stosując metodę powolnego schładzania oraz witrifikację.

Kriokonserwacja późnych morul i wczesnych blastocyst klaczy przynosi umiarkowane sukcesy (10, 22, 35-37). Po transplantacji zarodków o średnicy do

250  $\mu\text{m}$ , zamrożonych metodą tradycyjną, udało się uzyskać około 50% ciąży (36) i 33% (44), gdy osiągnęły średnicę 300-600  $\mu\text{m}$ . W przypadku większych zarodków nie zaobserwowano żadnych zażrebień (3). Po zastosowaniu techniki witrifikacji do mrożenia zarodków klaczy we wczesnym stadium rozwojowym uzyskano 60% ciąży (5, 30). W 1995 r. Hocht i wsp. (16) otrzymali 6 ciąży z 8 zarodków (o średnicy < 300  $\mu\text{m}$ ) poddanych witrifikacji, natomiast tylko 2 ciąży z 8 zarodków większych niż 300  $\mu\text{m}$ . Podobnie Caracciolo di Brienza i wsp. (6) uzyskali 6 ciąży po witrifikacji małych zarodków, jednak nie zaobserwowali ciąży w przypadku transferu 3 ekspandujących blastocyst. W pojedynczych przypadkach uzyskano dwie ciąży po witrifikacji zarodków klaczy o średnicy 800  $\mu\text{m}$  (33). Niepowodzenia w transferze witrifikowanych zarodków większych niż 300  $\mu\text{m}$  mogą być skutkiem pojawiania się w późniejszym stadium zarodka glikoproteinowej kapsuły (3, 10).

Kolejnym istotnym czynnikiem wpływającym na powodzenie kriokonserwacji zarodków jest wybór odpowiedniego środka osłaniającego (krioprotektora) (35). Brak właściwego krioprotektora powoduje śmierć zarodków w temperaturze poniżej  $-20^{\circ}\text{C}$ . Stosowane są dwa rodzaje krioprotektorów: nieprzenikające, np. poliwinylpirolidyna (PVP), sacharoza lub surowica oraz przenikające, np. dimetylosulfotlenek (DMSO), glicerol, glikol etylenowy, etanol. Samodzielnie środki nieprzenikające nie są w stanie zapewnić pełnej ochrony zamrażanym komórkom. Użycie ich w kombinacji ze środkami przenikającymi pozwala zminimalizować toksyczny wpływ wysokiej koncentracji pojedynczego krioprotektora. Efekt zastosowania poszczególnych krioprotektorów zależy od gatunku, sposobu mrożenia oraz od stadium rozwojowego zarodka. Do tradycyjnego mrożenia zarodków klaczy jako krioprotektor najczęściej stosowany był glicerol (24, 35) oraz obecnie glikol etylenowy (4, 10, 25).

Wraz z zastosowaniem krioprotektora pojawia się problem jego usunięcia z komórki po rozmrożeniu. Przełożenie zarodków bezpośrednio do medium pozbawionego krioprotektorów powoduje uszkodzenie ich komórek. Z tego względu należy je przekładać przez malejące stężenia środka osłaniającego lub umieścić w medium zawierającym stosunkowo wysokie stężenie związku nieprzenikającego (34).

Procedury powolnego mrożenia wymagają niskiej koncentracji krioprotektorów i kontrolowanego spadku temperatury w celu odwodnienia komórek. Podstawowym warunkiem jest usunięcie większości wody przed wstępnym zamrożeniem komórki, aby zapobiec powstawaniu wewnątrzkomórkowych kryształów lodu. Tradycyjne mrożenie odbywa się stopniowo, przy użyciu automatycznego freezera z kontrolowanym spadkiem temperatury.

Wykorzystując metodę powolnego mrożenia, udało się z powodzeniem zamrozić zarodki klaczy w słomkach z glicerolem jako głównym krioprotektorem (3,

35, 39). Metoda ta jest czasochłonna i wymaga kosztownego wyposażenia. Stosowanie jej w warunkach terenowych jest niepraktyczne.

Kriokonserwacja zarodków może przebiegać także na drodze witrifikacji (2, 7, 8, 19, 32). Metoda ta wymaga wysokiego stężenia krioprotektorów w celu zwiększenia lepkości płynów. Witrifikacja charakteryzuje się jednorodnym przejściem płynu w szklisty stan fizyczny. Nie dochodzi wtedy do formowania się niszczących kryształów lodu. Stan witrifikacji można uzyskać poprzez ultraszybkie ochładzanie i dodanie środków osłaniających w wysokich stężeniach (ok. 5 mol/L lub więcej) do pożywek zawierających zarodki.

Stosowanie wysokiego stężenia krioprotektorów wywiera szkodliwy wpływ na zarodki. Toksyczność krioprotektora jest minimalizowana poprzez skrócenie czasu ekspozycji na jego działanie przed zamrożeniem. Zarodki umieszcza się krótkotrwale w roztworze witrifikacyjnym i następnie w pojemnikach do mrożenia. Wysokie stężenie związków osłaniających powoduje, że zastosowanie właściwego okresu ekwilibracji w metodzie jest krytyczne dla przeżywalności zarodków. Konieczne jest szybkie usunięcie krioprotektora po rozmrożeniu.

Zarodki klaczy mogą być z powodzeniem mrożone w słomkach o pojemności 0,25 ml lub 0,5 ml. Skuteczność witrifikacji można zwiększyć poprzez przyspieszenie tempa schładzania, co wpływa na korzystniejsze osiągnięcie stanu zeszklenia. W tym celu stosuje się tzw. otwarte metody mrożenia: w słomkach Open Pulled Straws (OPS) (25, 30, 40) w kroplach płynu, w kropli zawieszony na nylonowej pętli (20, 30) – cryoloop lub cryotopie (19), gdzie zarodek umieszczony jest w kropli zawieszony w otworze w plastikowej bagietce z wydrążonym otworem. Techniki te pozwalają na kriokonserwację w zmniejszonej objętości płynów (2-10  $\mu\text{l}$ ), obniżenie stężenia środków osłaniających w mieszaninie witrifikacyjnej (40), a także na bezpośredni kontakt próbek z ciekłym azotem. Problemem jest zachowanie sterylności. Zanieczyszczenie może zostać wyeliminowane poprzez zefiltrowanie ciekłego azotu lub pakowanie OPS i plastikowych bagietek cryotop w większe 0,5 ml słomki (41) lub w sterylne obudowy. W przypadku technik otwartych tempo schładzania wzrasta do 10-40 tysięcy  $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ . Pozwala to zarodkom na szybkie przejście przez niekorzystny i krytyczny dla nich etap zmian temperatury.

Rozmrażanie zarodków po witrifikacji odbywa się w temperaturze pokojowej lub poprzez zanurzenie słomek w łaźni wodnej. Zarodki o rozmiarach od 300 do 900  $\mu\text{m}$  są bardziej wrażliwe na uszkodzenia w czasie rozmrażania w łaźni wodnej (16). Niezbędne jest ścisłe przestrzeganie czasu i temperatur, aby osiągnąć możliwy do zaakceptowania poziom przeżywalności zarodków po witrifikacji.

Metoda witrifikacji została wdrożona w 1985 r. do zamrażania zarodków myszy (32). W 1994 r. udało się uzyskać pierwsze dwie ciąży u koni po transplantacji

witryfikowanych zarodków (15). Oberstein i wsp. (30) w 2001 r. zastosowali z powodzeniem witryfikację OPS (Open Pulled Straws) dla kriokonserwacji moruli i blastocyst u kłaczy. W 2004 r. udało się uzyskać 4 ciąży po transferze witryfikowanych zarodków (6).

Pomimo uzyskania pojedynczych ciąży u kłaczy po transplantacji witryfikowanymi zarodkami prace nad tą metodą są w fazie początkowej (25, 30, 41). Wyniki badań po zastosowaniu witryfikacji wskazują na znaczne różnice w przeżywalności zarodków po rozmrożeniu (18, 27, 30). Dla zarodków we wczesnych stadiach rozwojowych witryfikacja okazuje się dużo bardziej obiecująca. Koszty tego sposobu mrożenia, czas i łatwość metody przemawiają na jej korzyść. Najnowsze próby skutecznego zamrożenia zarodków kłaczy bazują na przechowywaniu ich w 4°C przez 18-24 godziny przed witryfikacją (2, 17).

Witryfikacja może być z powodzeniem stosowana wymiennie z tradycyjną metodą mrożenia (27), chociaż niezbędne są dalsze badania nad zwiększeniem przeżywalności zarodków po zastosowaniu obydwu metod.

### Piśmiennictwo

- Allen W. R.: Embryo transfer in the horse, [w:] Adams C. E. (wyd.): Mammalian Egg Transfer. Boca Raton, FL. 1982, 135-154.
- Baca Castex C., Dalvit G., Miragaya M., Alonso A., Pinto M., Etcharren V., Castaneira C., Losimmo L.: 77 pregnancy rates after vitrification of fresh and cooled equine embryos using the cryotop method. *Reproduction, fertility and development* 2011, 23, 144.
- Barfield J. P., McCue P. M., Squires E. L., Seidel G. E. Jr.: Effect of dehydration prior to cryopreservation of large equine embryos. *Cryobiology* 2009, 59, 36-41.
- Bruyas J. F., Sanson E. L., Battut I., Fieni F., Tainturier D.: Comparison of the cryoprotectant properties of glycerol and ethylene glycol for early (day 6) equine embryo. *Journal of Reproduction and Fertility* 2000, 56 (suppl), 549-560.
- Campos-Chillon L. F., Suh T. K., Barcelo-Fimbres M., Seidel G. E. Jr., Carnevale E. M.: Vitrification of early-stage bovine and equine embryos. *Theriogenology* 2009, 71, 349-354.
- Caracciolo di Brienza V., Squires E. L., Zicarelli L.: Establishment of pregnancies after vitrification of equine embryos. *Reprod. Fertil. Dev.* 2004, 16, 165.
- Carnevale E. M.: Vitrification of equine embryos. *Vet. Clin. North Am. Equine Pract.* 2006, 22, 831-841.
- Castaneira P. N., Amaral D. C. G., Vasconcelos A. B., Arantes R. M. E., Stahlberg R., Lagares M. A.: Cryopreservation of equine embryos by vitrification. *Havemeyer Mon. Ser.* 2005, 14, 50-52.
- Dobrinjsky J. R.: Advancements in cryopreservation of domestic animal embryos. *Theriogenology* 2002, 57, 285-302.
- Eldridge-Pamuska W. D., Caracciolo di Brienza V., Seidel G. E. Jr., Squires E. L., Carnevale E. M.: Establishment of pregnancies after serial dilution or direct transfer by vitrified equine embryos. *Theriogenology* 2005, 63, 1308-1319.
- Fleury J. J., Fleury P. D. C., Landim Alvarenga F. C.: Effect of embryo diameter and storage period on pregnancy rates obtained with equine embryos stored in Ham's F10 with HEPEs buffer at a temperature of 15-18°C – preliminary results. *Theriogenology* 2002, 58, 749-750.
- Freeman D. A., Weber J. A., Geary R. T., Woods G. L.: Time of embryo transport through the mare oviduct. *Theriogenology* 1991, 36, 823-830.
- Gillard Kingma S. E., Thibault M. E., Betteridge K. J., Schlaf M., Gartley C. J., Chenier T. S.: Permeability of the equine embryonic capsule to ethylene glycol and glycerol in vitro. *Theriogenology* 2011, Epub ahead of print.
- Griffin J. L., Castleberry R. S., Schneider H. S. Jr.: Influence of day of collection on recovery rate in mature cycling mares (abstract). *Theriogenology* 1981, 15, s. 106.
- Hochi S., Fujimoto T., Braun J.: Pregnancies following transfer of equine embryos cryopreserved by vitrification. *Theriogenology* 1994, 42, 483-488.
- Hochi S., Fujimoto T., Oguri N.: Large equine blastocysts are damaged by vitrification procedures. *Reprod. Fertil. Dev.* 1995, 7, 113-117.
- Hudson J., Welch S. A., Squires E. L., Carnevale E. M., McCue P. M.: Vitrification of cooled equine embryos. *Proc. of the Annual Conference of the Society for Theriogenology* 2005, s. 783.
- Hudson J., McCue P. M., Carnevale E. M.: The effects of cooling and vitrification of embryos from mares treated with equine follicle-stimulating hormone on pregnancy rates after nonsurgical transfer. *J. Equine Vet. Sci.* 2006, 26, 51-54.
- Kuwayama M., Vajta G., Kato O., Leibo S. P.: Highly efficient vitrification method for cryopreservation of human oocytes. *Reprod. Biomed. Online* 2005, 11, 300-308.
- Lane M., Schoolcraft W. B., Gardner D. K.: Vitrification of mouse and human blastocysts using a novel cryoloop container-less technique. *Fertility and Sterility* 1999, 72, 1073-1078.
- Leibo S. P., Songsasen N.: Cryopreservation of gametes and embryos of non-domestic species. *Theriogenology* 2002, 57, 303-326.
- MacLellan L. J., Carnevale E. M., Coutinho da Silva M. A., McCue P. M., Seidel J. G. E., Squires E. L.: Cryopreservation of small and large equine embryos pretreated with cytochalasin B and/or trypsin. *Theriogenology* 2002, 58, 717-720.
- McKinnon A. O., Squires E. L., Voss J. L., Cook V. M.: Equine embryo transfer: a review. *Compendium of Continuing Education for the Practicing Veterinarian* 1998, 10, 343-355.
- Meira C., Alveranga M. A., Papa F. O.: Cryopreservation of equine embryos using glycerol and 1,2 propanediol as cryoprotectants (abstract). *Proc. Third Internat. Symp. Equine Embryo Transfer. Buenos Aires* 1992, s. 36.
- Moussa M., Bersinger I., Doligez P., Guigot F., Duchamp G., Vidament M., Mermillod P., Bruyas J. F.: In vitro comparisons of two cryopreservation techniques for equine embryos. Slow cooling and open pulled straws (OPS) vitrification. *Theriogenology* 2005, 64, 1619-1632.
- Moussa M., Duchamp G., Daels P. F., Bruyas J. F.: Effect of embryo age on the viability of equine embryos after cooled storage using two transport systems. *J. Equine Vet. Sci.* 2006, 26, 529-534.
- Moussa M., Duchamp G., Mahla R., Bruyas J. F., Daels P. F.: In vitro and in vivo comparisons of Ham's F10, EmCare holding solution and ViGro holding plus for the cooled storage of equine embryos. *Theriogenology* 2003, 59, 1615-1625.
- Moussa M., Tremoleda J. L., Duchamp G., Bruyas J. F., Colenbrander B., Bevers M. M., Daels P. F.: Evaluation of viability and apoptosis in horse embryos stored under different conditions at 5°C. *Theriogenology* 2004, 61, 921-932.
- Nelson C. F., Nelson L. D.: Cryopreservation of 7- to 9- day bovine embryos (abstract). *Theriogenology* 1988, 29, 281.
- Oberstein N., O'Donovan M. K., Bruemmer J. E., Seidel G. E. Jr., Carnevale E. M., Squires E. L.: Cryopreservation of equine embryos by open pulled straw, cryoloop or conventional slow cooling methods. *Theriogenology* 2001, 55, 607-613.
- Pjaff R. T.: Effects of cryoprotectants on viability of equine embryos. *Praca mgr., Colorado State University, Fort Collins* 1994.
- Rall W. F., Fahy G. M.: Ice-free cryopreservation of mouse embryos at -196°C by vitrification. *Cryobiology* 1985, 24, 387-402.
- Scherzer J., Fayrer-Hosken R. A., Ray L., Hurley D. J., Heusner G. L.: Advancements in large animal embryo transfer and related biotechnologies. *Reprod. Dom. Anim.* 2008, 43, 371-376.
- Schneider U., Mazur P.: Osmotic consequences of cryoprotectant permeability and its relation to the survival of frozen-thawed embryos. *Theriogenology* 1984, 21, 68-79.
- Seidel G. E.: Cryopreservation of equine embryos. *Vet. Clin. North Am. Equine Pract.* 1996, 12, 85-99.
- Slade N. P., Takeda T., Squires E. L., Elsdon R. P., Seidel G. E. Jr.: A new procedure for the cryopreservation of equine embryos. *Theriogenology* 1985, 24, 45-58.
- Squires E. L., Carnevale E. M., McCue P. M., Bruemmer J. E.: Embryo technologies in the horse. *Theriogenology* 2003, 59, 151-170.
- Squires E. L., Cook V. M., Voss J. L.: Collection and transfer of equine embryos. *Animal Reproduction Laboratory Bulletin No. 1, Fort Collins CO* 1985.
- Squires E. L., Seidel G. E. Jr., McKinnon A. O.: Transfer of cryopreserved equine embryos to progestin-treated ovariectomized mares. *Equine Vet. J.* 1989, 8 (suppl.), 89-91.
- Vajta G., Holm P., Kuwayama M., Booth P. J., Jacobsen H., Greve T., Callesen H.: Open pulled straw (OPS) vitrification: A new way to reduce cryoinjuries of bovine ova and embryos. *Mol. Reprod. Dev.* 1998, 51, 53-58.
- Vajta G., Nagy Z. P.: Are programmable freezers still needed in the embryo laboratory? Review on vitrification. *Reprod. Biomed.* 2006, 12, 779-796.
- Whittingham D. G., Leibo S. P., Mazur P.: Survival of mouse embryos frozen to -196°C and -269°C. *Science* 1972, 178, 411-414.
- Yamamoto Y., Oguri N., Tsutsumi Y., Hachinohe Y.: Experiments in the freezing and storage of equine embryos. *J. Reprod. Fertil.* 1982, 32 (suppl.), 399-403.
- Young C. A., Squires E. L., Seidel G. E., Kato H., McCue P. M.: Cryopreservation procedures for Day 7-8 equine embryos. *Equine Vet. J. Suppl.* 1997, 25, 98-102.