

ВИТРИФИКАЦИЯ НА НЕМАТУРИРАНИ СВИНСКИ ООЦИТИ

Цветелина Тодорова^{1*}, Янчо Тодоров¹

Институт по животновъдни науки, 2230 – Костинброд¹, България,

Селскостопанска академия, София

*Автор за кореспонденция: tzvetelinata@yahoo.com

Резюме

В проучването се сравнява ефективността на две комбинации от криопротектори, EG+DMSO и EG+PG използвани за витрификация на нематурирани свински ооцити. Направена беше оценка на токсичността на витрификационната среда, приготвена с двете комбинации на CPA. Жизнеспособността на ооцитите след 2 часа еквилибриране в EG+DMSO и EG+PG базирани среди беше много висока, но по-ниска ($P < 0,01$) от тази, която беше наблюдавано при контролната група. При 18 часа след IVF, броя на нематурираните ооцити ($<12\%$) и дегенерираните ооцити ($<3\%$) бяха сходни за всички групи. Получените резултати доказаха, че комбинацията от CPA, в който DMSO беше заменен с PG е по-малко токсична за нематурирани свински ооцити. Витрифицирани ооцити в EG+DMSO показват намалена ефективност при оплождане в сравнение с EG+PG – витрифицираните и контролните ооцити.

Ключови думи: витрификация, криопротектори, нематурирани ооцити, вине

Увод

Успешното криоконсервиране на свински ооцити е от решаващо значение за запазването и управлението на ценни генетични ресурси. В допълнение, криоконсервацията на ооцити може да бъде важна при прилагането на репродуктивните технологии, като *in vitro* производство на ембриони, генно инженерство и нуклеарен трансфер. По-голямата чувствителност на свинските ооцити към хипотермия се отдава на голямото количество липиди в цитоплазмата, което от своя страна прави криоконсервацията много по-неефективна в сравнение с други домашни видове. Количеството мастни киселини в нематурираните свински ооцити е два пъти по-голямо от това при говеждите ооцити. Успешната криоконсервация на свински ооцити беше постигната за първи път от Isachenko et al., (1998). В момента витрификацията изглежда най-добрата алтернатива за криоконсервиране на нематурирани ооцити. Ултразвуковите процедури водят до високи скорости на охлаждане по време на витрификация, което намалява неблагоприятните ефекти, свързани с високите концентрации на криопротектори (CPA) и намалява уврежданията от замразяването.

Ogawa et al., (2010) постигат развитие до стадий бластоцист при матурирани и нематурирани свински ооцити, които са били витрифицирани чрез криоустройство „Криотоп“. Мейотичният стадий, силно влияе върху способността на свинските ооцити да бъдат витрифицирани, а ооцити в метафаза II (МП) са традиционно предпочитани за витрификация. Въпреки, че оцеляването на нематурираните ооцити при *in vitro* матурация след витрификация е сравнително високо, след *in vitro* оплождане компетентността за развитие е сериозно компрометирана, (Egerszegi et al., 2013).

Изследвания на Somfai and Hirao, (2021) разкриват неуспех в образуването на мъжки пронуклеус при витрифицирани в стадий МП ооцити след оплождане. Витрификация на етап МП индуцира партеногенеза и намалява нивото на глутатиона в цитоплазмата. Обратно на това, ооцитите витрифицирани като кумулусно ооцитни комплекси (КОК) в стадий на герминален везикул (GV) с ниски проценти на оцеляване, запазват способността си да се подлагат на нормално оплождане. В допълнение, чрез витрификация при този етап може да се избегне повреда на делителното вретено, което е едно от най-честите промени, наблюдавани при витрифицирани в МП ооцити. Въпреки, че са получени живи потомци от витрифицирани незрели ооцити, процента на общо получените бластоцисти остава много нисък (Somfai et al., 2022).

Един от факторите, ограничаващи витрификацията на нематурираните ооцити е тяхната по-ниска пропускливост на CPA в сравнение с матурирани ооцити, което може да доведе до ниска преживяемост. Освен това, наличието на кумулусни клетки влияе на пропускливостта, намалявайки ефективността на протоколите за витрификация. Денудацията не е опция за справяне с този проблем, тъй като кумулусните клетки са важни за цитоплазменото съзряване на ооцитите и допринасят за митохондриалните функции, (Cui et al., 2009). Следователно изборът на силно пропускливи комбинации от CPA трябва да бъдат стратегия, използвана за преодоляване на това ограничение. Комбинирането на CPA има предимството да намалява общата концентрация на CPA необходими за витрификация, което намалява токсичността на разтвора за витрификация.

Проникващите CPA, които най-често се използват за криоконсервация на ооцити са етилен гликол (EG), глицерол, диметил сулфоксид (DMSO), пропилен гликол (PG) и ацетамид. Сред тях, EG, който има висока степен на проникване и ниска токсичност, е доказано, че е най-ефективният CPA за свински ооцити (Huang et al., 2008) и се използва самостоятелно или в комбинация с DMSO, (Fujihira et al., 2004). Въпреки, че комбинацията на EG и DMSO е доказано, че е много ефективна при витрификацията на свински ембриони, DMSO е вреден и засяга мейотичната компетентност в стадий GV при свински и миши ооцити, (Somfai et al., 2013). Тези изследвания предполагат, че DMSO може да не е подходящ за витрификация на ооцитите и по този начин PG може да бъде подходящ заместител на DMSO. Този CPA е по-силно проникващ от DMSO и EG както за свински ооцити, така и за ембриони. Замяната на DMSO с PG ще намали токсичността и ще увеличи способността за пенетрация на витрификационните разтвори, като може да се подобри ефективността на витрификацията на незрели свински ооцити.

Целта на проучването беше да се оцени ефективността на две комбинации от криопротектори, EG + DMSO и EG + PG, използвани за витрификация на свински нематурирани ооцити. Изследвахме жизнеспособността, оплождането и компетентността за развитие на ооцити, витрифицирани с помощта на двете комбинации от CPA.

Материал и методи

Получаване на яйчниците

Яйчниците бяха получавани от хибридни прасета за угояване от кланицата в гр. Костинброд. Използвани бяха само яйчници от препубертетни здрави прасета, които нямат наличие на жълти тела. При транспортиране до лабораторията яйчниците се поставяха в 0,9% разтвор на NaCl съдържащ 70 mg/mL канамицин при 36°C. При пристигането си в лабораторията яйчниците се съхраняваха в пресен 0,9% разтвор на NaCl при 36°C, до обработката им. Ооцитите бяха получени чрез нарязване на антрални фоликули с диаметър от 3 до 6 mm в диаметър. Промиването на КОК се извършваше с помощта на модифицирана

Dulbecco PBS среда (mDPBS). Селектирани бяха само ооцити с компактна кумулусна маса с равномерно гранулирана и тъмна цитоплазма.

***In vitro* матуриране**

За *in vitro* матуриране, ооцитите се промиваха три пъти в среда TCM-199 допълнена с 0,57-mM цистеин. От 70 до 80 ооцита бяха прехвърлени във всяка ямка на четири гнездови Nunc плаки, съдържаща 400 μ L среда за матуриране, покрита с темперирано парафиново масло. Ооцитите бяха инкубирани при 39°C във въздух с 5% CO₂ и 95% до 97% относителна влажност за 22 часа в среда за матуриране допълнена с 10 IU/mL eCG (equine chorionic gonadotropin) (Folligon) и 10 IU/mL hCG (human chorionic gonadotropin) (Corion) и се инкубираха отново за още 22 часа в същата среда без хормони.

***In vitro* оплождане**

След матурирането се извършваше *in vitro* оплождане, като ооцитите бяха третирани с 0,1% хиалуронидаза в среда NCSU-23 и се разклаща с вортекс за 2 минути при 1660 кръга/минута за премахване на кумулусните клетки. Оголените ооцити бяха промивани три пъти при матуриране и три пъти при предварително еквилибриране в среда за оплождане. След промиване оголените ооцити се поставяха в 50 μ L капки от среда за оплождане в 35 x 10-mm петриеви панички под парафин. Ооцитите се инкубираха при 39°C в атмосфера от 5% CO₂ за 30 минути, до добавянето на сперматозоидите. Семенната течност от нерез беше обработена и криоконсервирана в 0,5-mL пайети. Пайетите се размразяваха във водна баня при 37°C за 20 секунди. След това размразената семенна течност се промива три пъти чрез центрофугиране при 1900 x g за 3 минути в 10 mL mDPBS и получената пелета се суспендира в средата за оплождане. След подходящо разреждане, 50 μ L от тази сперматозоидна суспензия се добавяше към 50- μ L капка среда за оплождане, съдържаща ооцитите. Съотношението сперматозоиди : ооцити беше 1000:1. Ооцитите бяха инкубирани със сперматозоидите за 5 часа при 39°C и 5% CO₂ във въздуха и максимална влажност.

***In vitro* култивиране**

Предполагаемите зиготи се култивираха в продължение на 7 дни в четири ямкови платки, съдържащи 500 μ L среда NCSU-23 покрита с парафиново масло. За първите 2 дни средата без глюкоза NCSU-23 беше допълнена с 0.33-mM пируват и 4.5-mM лактат, а след това се поставяха в свежа среда NCSU-23, съдържаща 5,5-mM глюкоза, допълнена с 10% фетален телешки серум при 39° C във въздух с 5% CO₂ и 95% до 97% относителна влажност. Два дни след оплождането, скоростта на разделяне (брой дву- и четириклетъчни ембриони/общо култивирани ембриони) беше отчетено. На 7-ия ден образуваните бластоцисти се отчитаха процентно (брой бластоцисти/общо разделени ембриони) и обща скорост на образуване на бластоцисти (брой бластоцисти/общо култивирани ембриони) бяха оценени.

Витрификация и затопляне

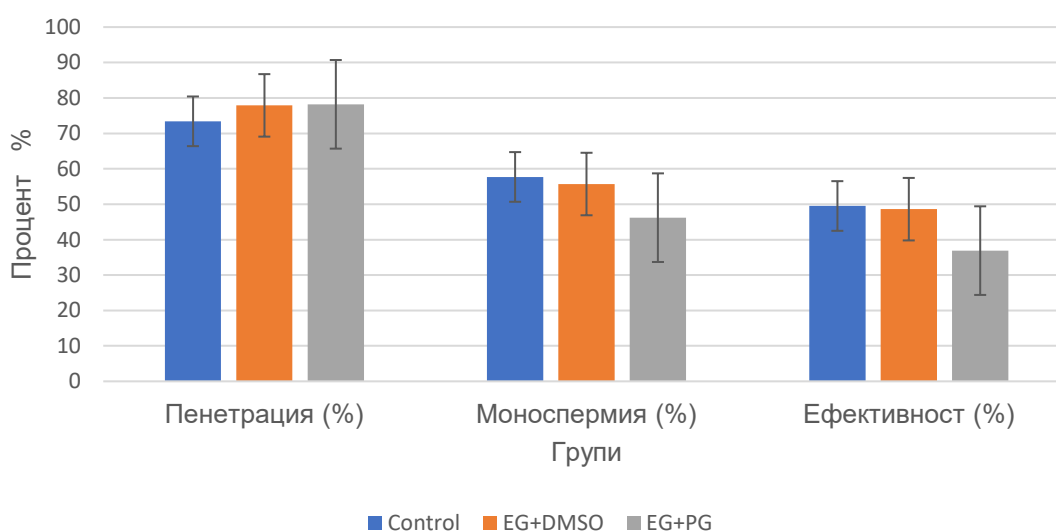
Ооцитите се обработваха в среда при 39°C. Групи от пет до седем ооцита се промиваха два пъти в TL-PVA и последователно бяха еквилибрирани във витрификационна среда V1 за 3 минути и витрификационна среда V2 за 1 минута за витрификация. По време на окончателното еквилибриране, ооцитите се поставяха в 1- μ L капка и се зареждаха в тесния край на изтеглена на пламък пайета чрез капиларно действие. В следствие пайетите, съдържащи ооцитите, бяха потопени хоризонтално в течен азот. След съхранение в течен азот за 2 седмици, пайетите бяха извадени от азота и затоплени с едностъпков метод на

затопляне. Накратко, пайетите бяха вертикално потопени в една ямка на четири гнездови Nunc плаки, съдържаща 800 μ L затопляща среда и еквилибрирани за 5 минути.

Резултати и обсъждане

При проведеният експеримент оценихме в три повторения токсичността на витрификационната среда, приготвена с две различни комбинации на CPA (EG + DMSO или EG + PG групи). Ооцитите бяха подложени на еквилибриране в разтвори за витрификация и затопляне, но не бяха витрифицирани. Ооцитите са еквилибрирани в TL-PVA среда без CPA и след това в затоплящ разтвор бяха използвани като контроли. Ооцити с лизирана цитоплазмена мембрана след 44 часа от матурирането се считаха за дегенерирали. След 18 часа IVF се правеше оценка на параметрите на оплождане. По това време нематурирани и дегенерирали ооцити не са взети предвид при изчислението на степента на пенетрация, моноспермия и ефективност. Останалите предполагаеми зиготи се култивираха *in vitro* и параметрите на развитие на получените ембриони от ооцити, изложени на CPA, бяха сравнени с тези от контролните ооцити.

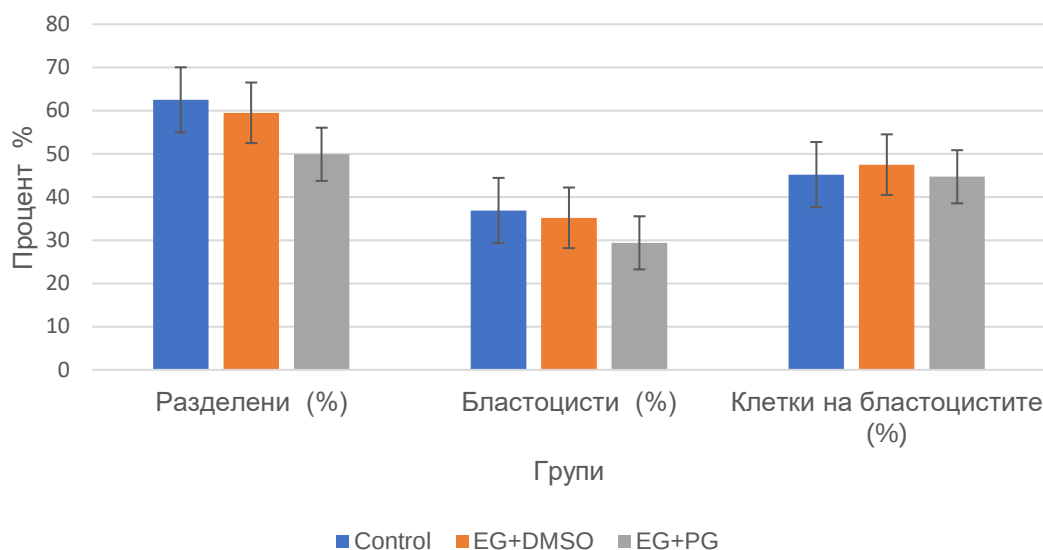
Жизнеспособността на ооцитите след 2 часа еквилибриране в EG+DMSO и EG+PG базирани среди беше много висока, но по-ниска ($P < 0,01$) от тази, която беше наблюдавано при контролната група. При 18 часа след IVF, броя на нематурираните ооцити ($< 12\%$) и дегенерираните ооцити ($< 3\%$) бяха сходни за всички групи. Както е показано на фигура 1, не са наблюдавани разлики в пенетрацията, моноспермията и ефективността между третираните групи.



EG – ethylene glycol (етилен гликол), **PG** – propylene glycol (пропилен гликол),
DMSO - dimethyl sulfoxide (диметил сулфоксид)

Фигура 1: Параметри на оплождане на контролни и третиран ооцити, класифицирани като живи 2 часа след излагане на криопротектори.

Излагането на ооцитите на CPA също повлия на способността им за развитие по отношение на разделянето и скоростта на образуване на бластоцити, както и на общия брой клетки в бластоцитите (Фигура 2).



EG – ethylene glycol (етилен гликол), **PG** – propylene glycol (пропилен гликол),
DMSO - dimethyl sulfoxide (диметил сулфоксид)

Фигура 2: *In vitro* развитие на ембриони след матуриране и оплождане на контролни и третиранни ооцити, класифицирани като живи 2 часа след излагане на криопротектори.

Somfai et al. (2014), успешно получават бластоцисти от витрифицирани свински нематурирани ооцити чрез частично оголване на КОК преди витрификацията и предварителна обработка с цитохалазин В.

Нашите резултати показват, че свинските нематурирани ооцити витрифицирани с използване на EG + DMSO или EG + PG химически дефинирани среди и след това оплодените са се развили до бластоцисти. Въпреки това, общата ефективност на процедурата остава ниска, въпреки че качествата на бластоцистите не са засегнати по отношение на общия брой клетки, витрификацията е причинила значително намаляване на жизнеспособността на ооцитите.

Това проучване имаше за цел да сравни резултатите от витрификацията на свински нематурирани ооцити с нова комбинация от CPA, в която DMSO беше заменен с PG. Тази нова комбинация има две предимства, а именно доказано е, че е по-малко токсична за нематурирани свински ооцити в сравнение с други CPA. Очаквахме тази комбинация от CPA да осигурява по-добра защита срещу криоувреждания с ниска токсичност и следователно да бъде по-подходяща за нематурирани свински ооцити, за които проникващата способност на CPA е ограничаващ фактор. Тъй като токсичността на CPA е важен проблем ние подобриме протоколите за витрификация и оценихме ефектите от двете комбинации от CPA при матуриране, оплождане и развитие на ембриона. Въпреки че жизнеспособността на ооцити 2 часа след излагане на CPA е значително по-ниска от тази на контролите, този резултат вероятно не е толкова биологично значим, тъй като повече от 94% от ооцитите бяха класифицирани като жизнеспособни във всички третиранни групи. Нашите резултати са сравними с докладваните по-рано за нематурирани ооцити, изложени на среда за витрификация с EG като единствен CPA (Somfai et al., 2010).

От друга страна, излагането на CPA е токсично за ооцитите, което стана ясно след 44 часа IVM. По това време, представени по-висок брой ооцити от третираните групи проявяват

признаци на дегенерация в сравнение с контролните ооцити (съответно 18% срещу 7%). Въпреки че механизмите на токсичност са неясни, известно е, че CPA причиняват промени в организацията на микротубулите в ооцитите на мишки, зайци и говеда. При прасета, излагането на нематурирани ооцити на високи концентрации на CPA може да предизвикат разрушаване на цитоскелета и прекомерният осмотичен стрес, може да причини увреждане на мембраната в ооцитите. Всички тези ефекти може да бъдат отговорни за увеличения брой дегенерирани ооцити, около 60%, открити след IVM. Резултатите от степента на дегенерация на ооцитите след IVM са подобни на докладваните от Somfai et al. (2014) 66,9%, като използват EG + PG среда и 38°C като температура на затопляне.

Въпреки, че общата ефективност на двете витрификационни среди е сходна по отношение на образуването на бластоцисти, появата на сублетално увреждане, причинено от витрификацията и затоплянето имаше различна динамика в зависимост от използваната комбинация от CPA.

Витрифицирани ооцити в EG + DMSO показват намалена ефективност при оплождане в сравнение с EG + PG-витрифицираните и контролните ооцити. Въпреки че причините за тези различия са неясно, резултатите показват, че по-високата пропускливост на PG защитава по-добре ооцитите в сравнение с DMSO по отношение на ефективността на оплождане.

Получените резултати показват, че независимо от комбинацията на CPA, витрифицираните ооцити проявяват намалена способност да се развиват до стадий бластоцист след IVF в сравнение с контролните невитрифицирани ооцити.

Изводи

При липса на витрификация и затопляне, токсичните ефекти на витрификационната среда върху нематурираните свински ооцитите са минимални и подобни за двете комбинации на CPA.

Ооцити, класифицирани като жизнеспособни след експозиция на CPA и IVM, показват подобни нива на оплождане и капацитет за развитие като контролните невитрифицирани ооцити. Въпреки, че ооцитите витрифицирани в стадий GV имат умерен процент на преживяемост, оплождането не е засегнато, когато EG + PG е използван като CPA комбинация. Напротив, комбинацията от EG + DMSO има по-ниска ефективност на оплождане от EG + PG и контролната група.

Нашите резултати показаха, че висококачествени бластоцисти могат да бъдат произведени от витрифицирани нематурирани ооцити. Въпреки това процентът на бластоцисти остава много нисък и компетентността за развитие на витрифицираните ооцити беше намалена в сравнение с невитрифицираните контроли. В допълнение, IVM при определени условия може да бъде важен фактор засягащ възстановителните механизми във витрифицираните ооцити.

Vitrification of immature pig oocytes

Tsvetelina Todorova^{1*}, Iancho Todorov¹

Abstract

The study compared the effectiveness of two combinations of cryoprotectants, EG+DMSO and EG+PG used for vitrification of immature porcine oocytes. The toxicity of the vitrification medium prepared with the two CPA combinations was evaluated. Oocyte viability after 2 hours of equilibration in EG+DMSO and EG+PG based media was very high but lower ($P < 0.01$) than that observed in the control group. At 18 h post-IVF, the number of immature oocytes ($<12\%$) and degenerated oocytes ($<3\%$) were similar for all groups. The obtained results proved that the combination of CPA in which DMSO was replaced by PG was less toxic to immature porcine oocytes. Vitrified oocytes in EG+DMSO showed reduced fertilization efficiency compared to EG+PG vitrified and control oocytes.

Keywords: vitrification, immature oocyte, porcine, cryoprotectant

Литература

- Cui, M.S., Fan, Y.P., Wu, Y., Hao, Z.D., Liu, S., Chen, X.J. (2009): Porcine cumulus cell influences ooplasmic mitochondria-lipid distributions, GSH-ATP contents and calcium release pattern after electro-activation, *Theriogenology*, 71:412–21.
- Egerszegi, I., Somfai, T., Nakai, M., Tanihara, F., Noguchi, J., Kaneko, H. (2013): Comparison of cytoskeletal integrity, fertilization and developmental competence of oocytes vitrified before or after in vitro maturation in a porcine model, *Cryobiology*, 67:287–92.
- Fujihira, T., Kishida, R., Fukui, Y. (2004): Developmental capacity of vitrified immature porcine oocytes following ICSI: effects of cytochalasin B and cryoprotectants, *Cryobiology*, 49:286–90.
- Huang, J., Li, Q., Zhao, R., Li, W., Han, Z., Chen, X. (2008): Effect of sugars on maturation rate of vitrified-thawed immature porcine oocytes, *Animal Reproduction Science*, 106:25–35.
- Isachenko, V., Soler, C., Isachenko, E., Perez-Sanchez, F., Grishchenko, V. (1998): Vitrification of immature porcine oocytes: effects of lipid droplets, temperature, cytoskeleton, and addition and removal of cryoprotectant, *Cryobiology*, 36:250–3.
- Ogawa, B., Ueno, S., Nakayama, N., Matsunari, H., Nakano, K., Fujiwara, T. (2010): Developmental ability of porcine in vitro matured oocytes at the meiosis II stage after vitrification, *J. Reprod. Dev.*, 56:356–61.
- Somfai, T., Noguchi, J., Kaneko, H., Nakai, M., Ozawa, M., Kashiwazaki, N. (2010): Production of good-quality porcine blastocysts by in vitro fertilization of follicular oocytes vitrified at the germinal vesicle stage, *Theriogenology*, 73:147–56.
- Somfai, T., Yoshioka, K., Tanihara, F., Kaneko, H., Noguchi, J., Kashiwazaki, N. (2014), Generation of live piglets from cryopreserved oocytes for the first time using a defined system for in vitro embryo production, *PLoS One*, 9:e97731.
- Somfai, T., Hirao, Y. (2021): Vitrification of immature bovine oocytes in protein-free

media: The impact of the cryoprotectant treatment protocol, base medium, and ovary storage, *Theriogenology*, 172: 47–54.

Somfai, T., Ogata, K., Takeda, K., Hirao, Y. (2022): Bulk vitrification of in vitro produced bovine zygotes with-out reducing developmental competence to the blastocyst stage, *Cryobiology*, 106: 32–38.

Somfai, T., Men, N.T., Junko, N., Kaneko, H., Kashiwazaki, N., Kikuchi, K. (2015): Optimization of cryoprotectant treatment for the vitrification of immature cumulus-enclosed porcine oocytes: comparison of sugars, combinations of permeating cryoprotectants and equilibration regimens, *J Reprod Dev*, 61: 571–579.

Somfai, T., Nakai, M., Tanihara, F., Noguchi, J., Kaneko, H., Kashiwazaki, N. (2013): Comparison of ethylene glycol and propylene glycol for the vitrification of immature porcine oocytes, *J Reprod Dev*, 59:378– 384.

Taniguchi, M., Arikawa, R., Kaedei, Y., Tanihara, F., Namula, Z., Viet, V.L. (2011): Effects of cryoprotectant agents and equilibration methods on developmental competence of porcine oocytes, *Cryo Lett*, 32:410–4.