



FEDERÁLNÍ ÚŘAD
PRO VYNÁLEZY

POPIS VYNÁLEZU

K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

271 593

(21) PV 5758-88.W
(22) Přihlášeno 24 08 88

(40) Zveřejněno 14 11 89
(45) Vydáno 02 09 91

(11)

(13) B1

(51) Int. Cl. ⁵
A 61 D 1/10

(75) Autor vynálezu LANDA VLADIMÍR ing. CSc.,
LIEHMAN PAVEL ing. CSc.,
TEPLÁ OLGA, PRAHA

(54) Způsob kryokonzervace embryí savců

(57) Řešení se týká způsobu kryokonzervace embryí savců a produktů mikročirurgických a genetických manipulací na úrovni embryí přímým nakapáním do kapalného dusíku, které je umožněno dehydratací embryí před začátkem zmrazování krátkodobým pobytem v ekvilibračním a potom ve vitrificačním médiu. Ve vitrificačním médiu jsou embrya a produkty různých typů manipulací nakapávána do kapalného dusíku. Mikrokapky se zmrazenými embryi o objemu 5 až 20 µl jsou uchovávány podle potřeby. Embrya jsou rozmrazována přenesením kapky s embryi z kapalného dusíku do kapky manipulačního média s 0,5 až 1,0 M roztokem sacharózy. Po rozpuštění kapky jsou embrya přenesena na 3 až 10 minut do nové kapky média se sacharózou a potom jsou promyta v manipulačním nebo kultivačním médiu a připravena k dalšímu použití.

Vynález se týká způsobu kryokonzervace embryí savců a různých produktů mikrocirurgických a genetických manipulací (PMGM) na embryích jejich přímým nakapáním do kapalného dusíku.

Techniky v oblasti řízené reprodukce a experimentální embryologie umožňují získávat preimplantační embrya od všech běžně využívaných laboratorních a hospodářsky významných savců, řady zoofonních savců a člověka a současně řeší práci se získanými embryi mimo mateřský organismus (např. izolaci z výplachu, selekci různého typu, mikrocirurgické a genetické zásahy do embryí na buněčné (subbuněčné) genové úrovni a jiné) se zachováním možnosti přenést tato embrya do vhodných příjmců, a umožnit tak dokončení započatého vývoje. Řízené hormonální stimulace ovariálních cyklů umožňují získávat 2 až 20krát více embryí než ve spontánních cyklech, což umožňuje rozsáhlejší využití genetického a reprodukčního potenciálu vybraných samic. Zcela nové možnosti pro celou uvedenou oblast představuje úspěšné zmrazení a uložení intaktních nebo geneticky manipulovaných savčích embryí v bankách. Reverzibilní zastavení vývoje představuje jedinečné možnosti nejen pro základní a aplikovaný výzkum, ale nachází rozsáhlé uplatnění v zemědělské praxi, jako jsou např. banky genofondu, efektivní využití vybraných zvířat, transport zmrazených embryí místo živých zvířat, řízené zásahy do genetické výbavy jedinců.

Techniky umožňující úspěšnou kryokonzervaci embryí se značně liší v principech i v jednotlivých částech vlastních technik: tj. v přípravě embryí před zmrazením, v cyklu zmrazení - uchování - rozmrazení a ve způsobu ošetření embryí po rozmrazení (Heyman et al., *Contracept-Fertil-Sex* 15: 579, 1987; Massip et al., *Ann Med. Vet* 131: 515, 1987; Mobraaten, *J In Vitro Fert Embryo Transfer* 3: 28, 1986; Petters et al., *Theriogenology* 27: 507, 1987; Prather et al., *Theriogenology* 28: 195, 1987; Rall et al., *J Reprod Fertil* 70: 293, 1984; Schiwe et al., *Cryobiology* 24: 238, 1987; Takeda et al., *Theriogenology* 27: 285, 1987; Trounson et al., *Fertil Steril* 48: 843, 1987; Yoshiki et al., *Exp Anim (Tokyo)* 36: 379, 1987). Nejrozšířenější jsou techniky založené na částečné dehydrataci embryí pomocí pomalého zmrazování rychlostí 0,2 až 0,5 °C za minutu, při indukci tvorby ledu v extracelulárním médiu v teplotě kolem -7 °C do teplot nižších než -25 °C, nejčastěji -30 až -40 °C, přenesení embryí z těchto teplot do kapalného dusíku a jejich uchování v tomto prostředí a na rychlém rozmrazení 200 až 2 000 °C za minutu, které zabráňuje rekrystalizaci intracelulárně zmrzlé vody a tím i zničení nebo poškození embryí. Příprava embryí ke zmrazení je založená na jedno nebo více stupňovém, nejčastěji 2 až 3 stupňovém přidání kryoprotektivní látky, např. dimethylsulfoxid, glycerol, propandiol, do zmrazovacího média a ekvibraci embryí ve finální koncentraci kryoprotektiva, nejčastěji 1 až 2 molární po dobu 10 až 20 minut. Ošetření po rozmrazení je založeno na postupném snížení koncentrace kryoprotektiva nejčastěji ve 2 až 6 krocích, v rozmezí 10 až 15 minut; v poslední době je úspěšně využíváno jednostupňové vymytí kryoprotektiv přenesením embryí do roztoku 0,5 až 1,5 M sacharózy po dobu 10 až 20 minut před promytím v manipulačním médiu. Ve všech používaných postupech jsou embrya zmrazována v různých typech obalů, např. plastické dutinky různých typů, nádoby pro konzervaci buněk a tkání v kapalném dusíku, skleněné dutinky a ampule.

Zásadní nevýhodou uvedených technik je nutnost používat nákladná programovatelná zařízení. Mezi další nevýhody patří časová náročnost např. příprava a zmrazení trvá 1 až 3 hodiny, pracnost podmíněná mnohonásobnou manipulací s embryi, prodloužený pobyt embryí v nepříznivých podmínkách a nutnost dovážet vhodné obaly ke zmrazování. Uvedené techniky nezaručují vyšší než 80 % viabilitu rozmrazených embryí.

V posledních letech se rozvíjejí kryokonzervační techniky založené na přímém ponoření obalů obsahujících embrya, např. různé typy dutinek z plastu, do kapalného du-

síku (Bielanski, Cryo-Letters 8: 293, 1987; Friedler et al. Fertil Steril 48: 306, 1987; Hsu et al. Jpn J Anim Reprod 32: 106, 1986; Massip et al. Cryo-Letters 7: 270, 1986; Massip et al. Theriogenology 27: 69, 1987; Miyamoto and Ishibashi, J Reprod Fertil 78: 471, 1986; Rall Cryobiology 23: 548, 1986; Rall and Fahy, Nature 313: 575, 1985; Scheffen et al, Cryo-Letters 7: 260, 1986; Szall and Schelton, J Reprod Fertil 78: 699, 1986). Při použití těchto technik je předpokladem úspěšné kryokonzervace vysoký stupeň dehydratace embryí již před začátkem zmrazování. Potřebného stupně dehydratace je dosahováno především převedením embryí do zmrazovacích vitrifikačních médií s vysokou koncentrací jedné kryoprotektivní látky, např. 30 až 50 % roztoku glycerolu nebo 30 až 40 % roztoku dimethylsulfoxidu, nebo několika kryoprotektivních látek, např. 25 % roztok glycerolu a 25 % roztok propandiolu nebo 20 % roztok dimethylsulfoxidu, 15 % roztok acetamidu, 10 % roztok propylenglykolu a 6 % polyethylenglykolu. Vitrifikační média odnímají embryím vodu a zabráňují tvorbě intracelulárního ledu. Embrya zmrazená vitrifikačními technikami vyžadují rozmrazení rychlostí 500 až 2000 °C za minutu. Příprava embryí před zmrazením probíhá při teplotě kolem 0 °C a představuje jedno-nebo dvoustupňové přidání kryoprotektivních látek. Po rozmrazení jsou kryoprotektivní látky odstraňovány jedno- nebo dvoustupňovým použitím manipulačního média s 0,5 až 1,0 M roztokem sacharózy. Ve většině případů byla embrya zmrazována v plastických dutinkách o obsahu 0,25 ml, které jsou ve většině států používány ke zmrazování inseminačních dávek u skotu. Dutinky jsou plněny tak, že kapka vitrifikačního média s embryi je od vymývacího média se sacharózou oddělena vzduchovou bublinkou. Po rozmrazení je nutné obě média protřepáním spojit a umožnit tak vymytí kryoprotektiv. Přes značné zjednodušení zůstává použití této techniky omezeno na dvoubuněčná a osmbuněčná embrya, moruly a blastocysty myši a na moruly skotu. Viabilita rozmrazených embryí myši se pohybuje v rozmezí 70 až 80 % a viabilita embryí skotu nepřesahuje 50 %.

Nevýhodou dosavadních vitrifikačních technik je toxicita používaných vitrifikačních médií vyžadující přidávání kryoprotektiv při teplotách kolem 0 °C, relativně nízká viabilita embryí po rozmrazení, možnost úspěšného použití pouze u některých vývojových stádií a druhů, např. myši, skotu a používání dovážených dutinek a jejich komplikované plnění.

Nevýhody dosud používaných technik kryokonzervace odstraňuje způsob kryokonzervace podle vynálezu spočívající v tom, že embrya a produkty mikromanipulací a genetických manipulací se z manipulačního média nejméně na 2 minuty přenesou do ekvilibračního média, obsahujícího 5 až 30 % obj. glycerolu, z tohoto média se přenesou na 15 až 60 sekund do vitrifikačního média, potom se s 5 až 20 μ l vitrifikačního média nasají do kalibrované kapiláry pro manipulaci s embryi, nakápnou do nádoby naplněné kapalným dusíkem a v transparentních kapkách vzniklých tímto způsobem jsou embrya a produkty mikromanipulací a genetických manipulací uchovávány v kapalném dusíku, ze kterého se před použitím kapky vyjmou a přenesou do vymývacího média obsahujícího 0,2 až 1,0 M roztok sacharózy, načež po roztátí kapek se embrya a produkty mikromanipulací a genetických manipulací přenesou na 3 až 10 minut do čerstvé kapky stejného média, potom se propláchnou v médiu bez sacharózy a připraví k dalšímu použití.

Produkty mikromanipulací a genetických manipulací (dále jen PMGM) jsou nakapány v mikrokapkách nejlépe 5 až 20 μ l vitrifikačního média přímo do kapalného dusíku. Postup zmrazování je následující:

- 1) intaktní embrya a PMGM jsou z manipulačního média přenesena na 2 až 10 minut do kapky ekvilibračního média s obsahem 5 až 30 nejlépe 10 % obj. glycerolu. Jako manipulační a ekvilibrační médium může být použito jakékoliv médium běžně používané pro práci se savčími embryi.

Doba pobytu v ekvilibračním médiu by neměla být kratší než 2 minuty, prodloužený pobyt v ekvilibračním médiu do 30 minut nemá vliv na výsledky zmrazování.

2) V minimálním množství ekvilibračního média jsou embrya a FMGM přenesena na 15 až 60 sekund do kapky vitrifikačního média připraveného z 15 až 35, nejlépe 30 % obj. glycerolu, 25 až 80 %, nejlépe 50 % obj. 2 M roztoku sacharózy v redestilované vodě a až do 40 %, nejlépe 20 % obj. krevního séra, s výhodou telecího či hovězího. Patnáctisekundový pobyt ve vitrifikačním médiu zajišťuje dostatečnou dehydrataci umožňující úspěšné zmrazení. Delší pobyt ve vitrifikačním médiu než 2 minuty může negativně ovlivnit výsledek zmrazování.

3) Do kalibrované kapiláry je nataženo poloviční množství, tj. 5 až 20 μ l vitrifikačního média a druhá polovina je natažena do kapiláry spolu se zmrazovanými embryi. Médium z kapiláry je nakápnuto z výšky nejlépe 5 až 7 cm do Petriho misky o průměru 60 mm nebo jiné vhodné nádoby naplněné kapalným dusíkem. Manipulační kapiláry lze vytáhnout ze skleněných trubiček o průměru 1 mm a opatřit je tlačkami z plastických hadiček odpovídajících rozměrů. Kapiláry jsou kalibrovány tak, aby po vytlačení média z kapiláry došlo k oddělení kapky bez zbytku média v kapiláře a bez kontaminace kapky vzduchovými bublinkami. Nejvýhodnější se ukázaly kapky o objemu 10 μ l.

4) Takto vzniklé transparentní kapky obsahující embrya jsou pomocí pinzety zchlazené v kapalném dusíku přeneseny do označených nádob, ve kterých jsou uchovávány. Během uchovávání a jakékoliv manipulace jsou kapky udržovány v kapalném dusíku.

5) Kapky určené k rozmrazení jsou zchlazenou pinzetou vyjmuty z kapalného dusíku a vloženy do vymývacího média s obsahem 0,2 až 1,0 nejlépe 0,5 M roztoku sacharózy. Po rozehrátí kapky jsou embrya přenesena do nové kapky média se stejnou koncentrací sacharózy a po 3 až 10 minutách jsou embrya nebo FMGM přenesena do média bez sacharózy, promyta a připravena k dalšímu použití, např. pro přenos do recipientu, kultivace in vitro atd. Příprava embryí a FMGM před zmrazováním a vymytí kryoprotektiv po rozmrazení probíhalo při teplotě 20 °C.

Způsob kryokonzervace podle vynálezu je ze všech používaných způsobů kryokonzervace nejrychlejší, nejjednodušší a ekonomicky nejvýhodnější. Další zjednodušení uvedeného kryokonzervačního postupu mohou být pouze nevýznamného charakteru, bez většího praktického významu. Uvedený způsob kryokonzervace umožňuje opakovaně dosahovat 90 % a vyšší životaschopnosti embryí a FMGM po ukončení uchovávání v kapalném dusíku, což představuje maximální hranici v oblasti kryokonzervace. Použitelnost uvedeného kryokonzervačního způsobu pro embrya různých druhů savců, pro různá vývojová stadia, pro intaktní embrya i embrya zbavená ochranných obalů, tzv. zóny pellucidy, pro produkty různých typů mikrochirurgických a genetických manipulací a pro různé typy embryonálních buněk dokumentuje univerzálnost navrženého způsobu kryokonzervace.

Použití tohoto způsobu je doloženo následujícími příklady.

Příklad 1

Z 200 osmibuněčných embryí získaných od hybridních myší a kryokonzervovaných přímým nakapáním do kapalného dusíku po 2 až 3 minutách v ekvilibračním médiu ve skupinách po 3 až 5, ve vitrifikačním médiu o složení 30 % obj. glycerolu, 50 % obj. 2 M roztoku sacharózy v redestilované vodě a 20 % obj. hovězího krevního séra, bylo po rozmrazení získáno 194 (97 %) životaschopných embryí. Dosažené výsledky charakterizované vysokou opakovatelností a úrovní přežívání představují maximum dosažitelné při konzervaci embrií dokumentují vhodnost použitého kryokonzervačního způsobu a délky pobytu v ekvilibračním médiu.

Příklad 2

Z 300 osmi až šestnáctibuněčných embryí získaných od šesti vybraných inbredních myších kmenů a kryokonzervovaných po 10 minutách v ekvilibračním médiu přímým nakapáním do kapalného dusíku ve skupinách po 3 až 5, ve vitrifikačním médiu uvedeném v příkladu 1, bylo po rozmrazení získáno 282 (94 %) životaschopných embryí. Dosažená vysoká opakovatelnost a maximální úroveň přežívání embryí dokumentují použitelnost způsobu kryokonzervace podle vynálezu, používajícího prodloužený pobyt v ekvilibračním médiu pro geneticky různorodá embrya.

Příklad 3

Ze 100 osmibuněčných embryí zbavených nebuněčných obalů a kryokonzervovaných přímým nakapáním do kapalného dusíku po 30 sekundách ve vitrifikačním médiu uvedeném v příkladu 1, bylo po rozmrazení získáno 93 (93 %) intaktních a životaschopných embryí. Výsledky dokumentují možnost kryokonzervace embryí a produktů manipulací zbavených nebuněčných obalů způsobem podle vynálezu při využití zkráceného pobytu ve vitrifikačním médiu, přičemž viabilita vysoko přesahuje všechny dosud dosahované výsledky kryokonzervace embryí bez nebuněčných obalů.

Příklad 4

Viabilita myších čtyř a šestnáctibuněčných embryí, morul a blastocyst kryokonzervovaných přímým nakapáním do kapalného dusíku, ve vitrifikačním médiu obsahujícím 20 % obj. glycerolu, 76 % obj. 2 M roztoku sacharózy v redestilované vodě a 4 % obj. telecího krevního séra, dosahovala po rozmrazení a vymytí v médiu s 1,0 M roztokem sacharózy 90 až 94 %. Výsledky dokumentují účinnost kryokonzervačního způsobu podle vynálezu, včetně možnosti využití vyšší koncentrace sacharózy při vymývání kryoprotektivní látky pro kryokonzervaci různých vývojových stádií.

Příklad 5

Embrya myši vystavená různým typům manipulací - mikrochirurgické enukleaci, elektrofuzi blastomer embryí, mikroinjekcí do cytoplasty nebo játra, reagregaci na blastomer při konstrukci chimer a partenogenetické aktivaci a kryokonzervována přímým nakapáním v 10 μ l kapkách do kapalného dusíku po 2 až 3 minutách v ekvilibračním médiu a po 60 sekundách ve vitrifikačním médiu, uvedeném v příkladu 1, byla po rozmrazení životaschopná a viabilita takto ošetřených a kryokonzervovaných embryí se pohybovala mezi 70 až 90 %. Výsledky dokumentují použitelnost způsobu kryokonzervace podle vynálezu pro různé typy mikrochirurgicky a geneticky manipulovaných embryí.

Příklad 6

Embrya krys ve stadiu čtyř a šestnáctibuněk a blastocysty a embrya skotu ve stadiu moruly a blastocysty kryokonzervovaná přímým ponořením do kapalného dusíku po 10 minutách v ekvilibračním médiu, uvedeném v příkladu 1 ve skupinách 1 až 2, byla po rozmrazení životaschopná. Viabilita embryí krys dosahovala 70 až 90 % a embryí skotu 75 až 85 %. Výsledky dokumentují možnost použití způsobu kryokonzervace podle vynálezu pro různá vývojová stadia embryí různých druhů savců.

PŘEDMĚT VYNÁLEZU

1. Způsob kryokonzervace embryí savců, vyznačující se tím, že embrya a produkty mikromanipulací a genetických manipulací se z manipulačního média nejméně na 2 minuty přenesou do ekvilibračního média obsahujícího 5 až 3 % obj. glycerolu, z tohoto média se přenesou na 15 až 60 sekund do vitrificačního média, potom se s 5 až 20 μ l vitrificačního média nasají do kalibrované kapiláry pro manipulaci s embryi, nakápnou do nádoby naplněné kapalným dusíkem a v transparentních kapkách vzniklých tímto způsobem jsou embrya a produkty mikromanipulací a genetických manipulací uchovávány v kapalném dusíku, ze kterého se před použitím kapky vyjmou a přenesou do vymývacího média, obsahujícího 0,2 až 1,0 M roztok sacharózy, načež po roztátí kapek se embrya a produkty mikromanipulací a genetických manipulací přenesou na 3 až 10 minut do čerstvé kapky stejného média, načež se propláchnou v médiu bez sacharózy a připraví se k dalšímu použití.

2. Způsob kryokonzervace podle bodu 1, vyznačující se tím, že vitrificační médium obsahuje 15 až 35 % obj. glycerolu, 25 až 80 % obj. 2 M roztoku sacharózy v redestilované vodě a až do 40 % obj. krevního séra, např. telecího či hovězího.