

Artykuł przeglądowy

## **Aktualny stan i możliwości kriokonserwacji zarodków i oocytów zwierząt gospodarskich**

**Barbara Gajda, Iwona Rajska**

Instytut Zootechniki Państwowy Instytut Badawczy, Dział Biotechnologii Rozrodu Zwierząt,  
ul. Krakowska 1, 32-083 Balice

**W artykule przedstawiono kierunki rozwoju oraz obecne możliwości kriokonserwacji oocytów i zarodków bydła, świń, owiec, kóz i koni, a także możliwości doskonalenia tej technologii. Zaprezentowano dwie zasadnicze metody kriokonserwacji: mrożenie i witrifikację. Omówiono główne czynniki warunkujące podatność zarodków i oocytów na kriokonserwację, a także możliwości jej modyfikacji.**

**SŁOWA KLUCZOWE: kriokonserwacja / zarodek / oocyt / zwierzęta gospodarskie**

Istotą kriokonserwacji gamet i zarodków jest zatrzymanie zachodzących w nich procesów życiowych na czas praktycznie nieograniczony. Jest to jak dotychczas jedyna metoda, za pomocą której udało się ten cel osiągnąć, gdyż próby liofilizacji materiału genetycznego, które mogły być alternatywą dla kriokonserwacji, nie dały oczekiwanych rezultatów.

Pierwsze eksperymenty z zakresu kriokonserwacji gamet męskich podejmowane były już w latach siedemdziesiątych XIX wieku, natomiast metody kriokonserwacji gamet żeńskich i zarodków nie mają tak długiej historii, sięgają bowiem lat pięćdziesiątych XX wieku.

Przełomowym momentem dla rozwoju kriokonserwacji materiału genetycznego było odkrycie przez Polge'a i wsp. w 1949 roku osłaniającej roli glicerolu. Pozwoliło to opracować we wczesnych latach pięćdziesiątych XX wieku metodę kriokonserwacji plemników, a dwadzieścia lat później także zarodków, dzięki teoretycznym pracom amerykańskiego kriobiologa Petera Mazura. Istotą tych prac było założenie, że dla skutecznej kriokonserwacji obiektów biologicznych wielkości komórek jajowych szybkość schładzania powinna wynosić ok. 1°C/min. Opierając się na tych założeniach, Whittingam i wsp. [142] oraz Wilmut i Rowson [146] we wczesnych latach siedemdziesiątych ubiegłego wieku dokonali skutecznego zamrożenia zarodków mysich. Następstwem było zastosowanie tych procedur do kriokonserwacji zarodków bydła i owiec, a później szeregu innych gatunków ssaków zarówno laboratoryjnych, jak i gospodarskich, z uwzględnieniem specyfiki gatunkowej w zakresie ich podatności na kriokonserwację.

Obecnie kriokonserwację zarodków i oocytów można przeprowadzać metodą zamrażania lub witrifikacji. Obok podstawowych różnic, jakie występują między tymi dwoma metodami kriokonserwacji, obie wymagają kontroli i optymalizacji warunków podczas każdego z etapów postępowania.

Zarodki i oocyty zamraża się w urządzeniach (fryzerach) umożliwiających uzyskanie kontrolowanego spadku temperatury. Z kriobiologicznego punktu widzenia zamrażanie jest to zestalanie się schładzanego płynu na drodze krystalizacji. Krystalizacja wewnątrzkomórkowa jest jedną z podstawowych przyczyn uszkodzeń komórek w trakcie zamrażania. Kriokonserwacja metodą witrifikacji, w której dochodzi do zestalania się płynu w formie zeszkłonej, a nie krystalicznej, eliminuje tę przyczynę uszkodzeń komórek. Metoda witrifikacji stanowi duże uproszczenie w stosunku do konwencjonalnych sposobów zamrażania. Głównym problemem witrifikacji jest toksyczność związków osłaniających oraz uszkodzenia natury osmotycznej. Są one powodowane wysoką koncentracją związków osłaniających, niezbędnych do uzyskania witrifikacji. Niemniej jednak metoda ta pozwala obecnie na uzyskanie znacznej efektywności kriokonserwacji w odniesieniu do zarodków mysich, szczurzych, króliczych, owczych, kozich, końskich i bydłych [41, 64, 115].

## BYDŁO

### Zamrażanie zarodków

Początkowo zarodki bydłce były kriokonserwowane metodą wolnego zamrażania i wolnego rozmrażania. Metoda ta została zastosowana po raz pierwszy przez Wilmuta i Rowsona w 1973 roku [146]. Specyficzne dla tego gatunku postępowanie dotyczyło wielostopniowego dodawania i usuwania związku osłaniającego, które przeprowadzano w temperaturze pokojowej. Najczęściej używanymi związkami osłaniającymi były dwumetylosulfotlenek (DMSO), glicerol i glikol etylenowy, rzadziej propandiol. Nie wykazano różnic w przeżywalności zarodków zamrażanych w glikolu etylenowym, DMSO czy glicerolu [13, 34], jak również w mieszaninie glicerolu i DMSO [72]. Obecnie uważa się, że do zamrażania zarodków bydłczych najbardziej przydatnymi związkami osłaniającymi są glikol etylenowy i glicerol. W kolejnych badaniach wprowadzono skrócony program zamrażania, poprzez podwyższenie końcowej temperatury zamrażania zarodków do  $-30$ ,  $-35^{\circ}\text{C}$  przed ich przełożeniem do ciekłego azotu [123]. Uzyskiwana przeżywalność zarodków zamrażanych metodą wolną lub szybką (skróconą) jest podobna. Najlepsze wyniki przeżywania zarodków zamrażanych metodą wolną (wolne schładzanie do  $-60^{\circ}\text{C}$ ) można osiągnąć stosując wolne rozmrażanie (ok.  $+20^{\circ}\text{C}/\text{min}$ ), natomiast zarodki przekładane do ciekłego azotu w wyższych temperaturach ujemnych ( $-30$  do  $-40^{\circ}\text{C}$ ) wymagają szybkiego rozmrażania (ok.  $+300^{\circ}\text{C}/\text{min}$ ). Można przyjąć, że wyniki przenoszenia mrożonych zarodków bydłczych są o ok. 10-20% niższe od tych, jakie uzyskuje się po przeniesieniu zarodków świeżych.

Poddając mrożeniu zarodki uzyskane metodą zapłodnienia i hodowli *in vitro* mamy do czynienia z organizmami o obniżonej wartości biologicznej. Badania prowadzone w tym zakresie potwierdzają niższą podatność na zamrażanie zarodków uzyskanych *in vitro* w porównaniu z zarodkami uzyskanymi *in vivo*. Stwierdzono, że ponad 80% kriokonserwowanych zarodków bydłczych uzyskanych *in vivo* wylęga się w hodowli *in vitro*, podczas gdy wylęga się tylko 20% zarodków kriokonserwowanych wytworzonych *in vitro* [41].

Przypuszcza się, że zróżnicowana podatność na zamrażanie zarodków uzyskanych *in vivo* i *in vitro* związana jest z jednej strony z różną zawartością wody w tych zarodkach [73], a z drugiej – z różnicą we właściwościach osłonki przejrzystej [103]. Wykazano, że osłonka przejrzysta zarodków uzyskanych *in vitro*, w porównaniu do zarodków uzyskanych *in vivo*, jest łatwiej trawiona przez enzymy, np. pronazę [103]. Wykazano również, że przeżywalność mrożonych zarodków wyprodukowanych pozaustrojowo zależy od tego czy hodowlę prowadzono w pożywkach syntetycznych Menez B2 lub TCM 199, czy też we współhodowli z komórkami nabłonka jajowodowego lub komórkami granulocy. Oznacza to, że wyższa efektywność zamrażania zarodków uzyskanych *in vitro* zależy będzie w większym stopniu od udoskonalenia technologii pozaustrojowej produkcji zarodków niż metody ich kriokonserwacji.

### **Zamrażanie oocytów**

Pierwsze próby kriokonserwacji oocytów ssaków sięgają lat siedemdziesiątych ubiegłego wieku, kiedy z pozytywnym skutkiem zastosowano do zamrażania oocytów mysich metody opracowane dla zarodków. Uzyskano wtedy płody i potomstwo z oocytów mysich zamrożonych i po rozmrożeniu zapłodnionych *in vitro*, jednak efektywność tych prób była niska [143]. Zastosowane procedury okazały się nieskuteczne dla zamrażania oocytów bydłowych. W kolejnych badaniach stwierdzono, że oocyty niedojrzałe są mniej podatne na kriokonserwację niż oocyty dojrzałe w stadium metafazy II [77]. Pierwsze cielęta po transplantacji zarodków rozwijających się z dojrzałych *in vitro* kriokonserwowanych oocytów uzyskano dopiero na początku lat dziewięćdziesiątych ubiegłego wieku [38].

Odrębny problem stanowi kriokonserwacja oocytów niedojrzałych (stadium GV). Pierwsze badania dotyczące kriokonserwacji niedojrzałych oocytów bydłowych prowadzone były we współpracy polsko-francuskiej [55]. Stwierdzono wówczas, że oocyty niedojrzałe są mało podatne na kriokonserwację, a zamrażanie znacznie obniża ich kompetencje do dojrzewania *in vitro*. Uzyskane przez tych autorów wyniki przeżywalności oocytów po rozmrożeniu były na niskim poziomie (6%). Choć uzyskano zdrowe potomstwo po kriokonserwowanych metodą zamrażania niedojrzałych oocytach bydłowych [97, 129], to jednak odsetek zarodków osiagających stadium blastocysty jest wciąż bardzo niski. W ostatnich latach badania z zakresu kriokonserwacji oocytów bydłowych koncentrują się głównie na zwiększeniu efektywności poszczególnych etapów metody, zarówno kriokonserwacji metodą witrifikacji, jak też dojrzewania i zapłodnienia *in vitro* [90].

### **Witrifikacja zarodków**

Zarodki bydłowe zostały po raz pierwszy zakonserwowane metodą witrifikacji [84, 85] przy zastosowaniu procedury opracowanej dla zarodków mysich. Mieszanina witrifikacyjna składała się z 25% glicerolu i 25% 1,2-propandiolu. Usuwanie związków osłaniających po rozmrożeniu było jednostopniowe, przy użyciu roztworu 1M sacharozy. Efektywność przenoszenia przy zastosowaniu opisanej procedury wynosiła od 20 do 50% [80, 84]. Metoda ta była efektywna dla zarodków w stadium moruli, podczas gdy nie przeżyła żadna z witrifikowanych blastocyst. Przypuszcza się, że blastocysty są bardziej wrażliwe niż morule na wysoką koncentrację propandiolu w mieszaninie witrifikacyjnej. Z kolei wiadomo, że propandiol jest związkiem łatwiej przenikającym do komórki niż glicerol, co może być przyczyną jej uszkodzeń natury chemicznej lub osmotycznej. Próby modyfikacji

procedury witrifikacji, polegające na wyeliminowaniu z mieszaniny witrifikacyjnej propandiolu pozwoliły na skuteczną witrifikację blastocyst bydłecych [138], choć obserwowana przeżywalność *in vitro* takich blastocyst była niezbyt wysoka (57%).

W poszukiwaniu optymalnej mieszaniny witrifikacyjnej dla zarodków bydłecych, Mahmoudzadeh i wsp. [81] przeprowadzili badania porównawcze różnych mediów witrifikacyjnych. Najwyższy odsetek – blisko 90% zarodków rozwijających się *in vitro*, stwierdzono po witrifikacji w mieszaninie glikolu etylenowego, fikolu i sacharozy (EFS) opracowanej przez Kasai i wsp. [63].

Jednym z ważnych czynników wpływających na przeżywalność witrifikowanych zarodków jest ich ekwilibracja przed witrifikacją. Aby uniknąć niekorzystnego wpływu wysokich koncentracji związków osłaniających, zarodki poddawano ekwilibracji wielostopniowej. W doświadczeniach własnych [120], przeprowadzonych z zarodkami bydłecymi ekwilibrowanymi trójstopniowo w mieszaninie glicerolu i propandiolu, obserwowano wysoką przeżywalność zarodków zarówno *in vitro* (90%), jak i *in vivo* (77%). Obserwacje te potwierdzają wyniki uzyskiwane przez innych autorów [66], którzy stosowali wielostopniową ekwilibrację do witrifikacji blastocyst bydłecych. Stwierdzono znacznie wyższą przeżywalność *in vitro* po 4-, 8- lub 16-stopniowej niż po 1- lub 2-stopniowej ekwilibracji [66].

Interesującą możliwością zwiększenia podatności zarodków na witrifikację jest poddawanie ich subletalnemu stresowi, wywołanemu wysokim ciśnieniem hydrostatycznym [106] lub podwyższoną koncentracją chlorku sodu [78]. Metoda wcześniejszego traktowania komórek podwyższonym ciśnieniem hydrostatycznym w połączeniu z techniką otwartych cienkich słomek, tzw. OPS (open pulled straw), z powodzeniem została zastosowana do witrifikacji blastocyst bydłecych uzyskanych *in vitro* [106, 135].

Efektywność witrifikacji zarodków bydłecych jest porównywalna z zamrażaniem [136, 137]. Uzyskiwano podobny odsetek siedmiodniowych zarodków bydłecych rozwijających się *in vitro* po kriokonserwacji zarówno metodą zamrażania (ok. 65%), jak i witrifikacji (ok. 66%) [74, 109].

Z obserwacji nad witrifikacją zarodków bydłecych wyprodukowanych *in vitro* wynika, że ich podatność na witrifikację jest obniżona w porównaniu do zarodków wyprodukowanych *in vivo* [40, 47]. Wykazano ponadto, że przeżywalność kriokonserwowanych zarodków uzyskanych *in vitro* zależy od tego, czy hodowlę prowadzono w pożywkach syntetycznych, czy też we współhodowli z komórkami nabłonka jajowodowego lub komórkami granulocy. Wydaje się zatem, że o przeżywalności kriokonserwowanych zarodków uzyskanych w wyniku zapłodnienia i hodowli *in vitro* w większym stopniu decydują metody hodowli niż metoda kriokonserwacji [84]. Próby modyfikacji pożywek do hodowli zarodków bydłecych uzyskanych po zapłodnieniu *in vitro* i następnie poddawanych kriokonserwacji w płynie z dodatkiem liposomów zawierających lecytynę, sfingomielinę i cholesterol nie przyniosły oczekiwanych rezultatów [108]. Stwierdzono jedynie, że dodatek liposomów nie wpływał negatywnie na rozwój zarodków do stadium blastocysty oraz ich przeżywalność po rozmrożeniu. Natomiast obecność w liposomach lecytyny obniżała przeżywalność kriokonserwowanych zarodków bydłecych, co może sugerować jej niekorzystne oddziaływanie na zmianę składu błony komórkowej. W kolejnych badaniach wykazano, że hodowla przed kriokonserwacją w pożywce bez dodatku białka pod postacią surowicy prowadzi do zmniejszenia poziomu zawartych w zarodkach lipidów oraz poprawy efektywności ich kriokonserwacji [6].

Również stadium rozwoju zarodka jest jednym z ważnych czynników wpływających na przeżywalność witrifikowanych zarodków bydłowych uzyskanych w wyniku zapłodnienia i hodowli *in vitro*. Obserwacje te potwierdzają badania własne, dotyczące witrifikacji zarodków bydłowych uzyskanych *in vitro* [40, 47], w których stwierdzono większą wrażliwość na witrifikację zarodków w stadium moruli niż blastocysty.

Reasumując, metoda witrifikacji może być alternatywą tradycyjnej metody zamrażania w kriokonserwacji zarodków bydłowych. Potwierdza to porównywalna przeżywalność po transplantacji niechirurgicznej zarodków witrifikowanych (44,5%) i zamrażanych metodą konwencjonalną (45,1%) [26].

Efektem prac nad witrifikacją zarodków bydłowych prowadzonych w Dziale Biotechnologii Rozrodu Zwierząt Instytutu Zootechniki PIB było urodzenie się w 1994 roku pierwszego w Polsce cielęcia [120] po przeniesieniu witrifikowanych zarodków.

### Witrifikacja oocytów

Doświadczenia dotyczące witrifikacji oocytów bydłowych prowadzono zarówno na oocytach niedojrzałych (stadium GV), jak i dojrzałych (stadium metafazy II). Początkowe próby witrifikacji oocytów w stadium GV nie dały pozytywnych wyników [5, 138], natomiast znaczny postęp uzyskano w witrifikacji oocytów w stadium metafazy II. Czynnikiem decydującym o przeżywaniu witrifikowanych oocytów, jak się wówczas wydawało, był skład mieszaniny osłaniającej [51, 141]. W doświadczeniach nad witrifikacją dojrzałych oocytów w glikolu etylenowym czy też w mieszaninie glicerolu i propandiolu nie uzyskano przeżywalności *in vitro* [5] lub przeżywało tylko niewiele oocytów [141]. Natomiast witrifikacja w mieszaninie opartej na DMSO i glikolu etylenowym lub DMSO, glikolu propylenowym i acetamidzie doprowadziła do uzyskania po rozmrożeniu dość wysokiego odsetka (blisko 90%) morfologicznie normalnych oocytów [51]. Odznaczały się one dość dobrą zdolnością do zapłodnienia, a uzyskane blastocysty były zdolne do pełnego rozwoju *in vivo*. Innym czynnikiem, istotnym zdaniem autorów dla przeżywalności witrifikowanych oocytów, było wielostopniowe usuwanie związków osłaniających po rozmrożeniu.

W badaniach przeprowadzonych przez Horvarth i Seidela [58], z wykorzystaniem cholesterolu w medium do kriokonserwacji oocytów, obserwowano nieznaczny wzrost odsetka zarodków dzielących się i rozwijających do stadium 8 komórek z oocytów poddawanych przed witrifikacją działaniu cholesterolu i następnie zapładnianych *in vitro* w porównaniu do kontrolnych.

Zastosowanie próżni w komorze z ciekłym azotem (Vitmaster), w której witrifikację osiąga się poprzez ultraszybkie schłodzenie próbki oraz otwartych cienkich słomek (OPS), umożliwiło efektywną witrifikację oocytów bydłowych zarówno dojrzałych (stadium metafazy II), jak i niedojrzałych (stadium GV) [4]. Cytowani autorzy osiągnęli wysoki odsetek zarodków dzielących się i blastocyst (odpowiednio 72 i 38%) dla oocytów witrifikowanych w stadium metafazy II, jak również dość dobre wyniki (27% zarodków dzielących się i 14% blastocyst) dla oocytów witrifikowanych w stadium GV. Stosując witrifikację w słomkach OPS uzyskano również cielęta po przeniesieniu zarodków uzyskanych z witrifikowanych dojrzałych oocytów [135]. Wyniki te dowodzą, że istnieje możliwość efektywnej witrifikacji zarówno dojrzałych, jak i niedojrzałych oocytów bydłowych.

## ŚWINIA

### Zamrażanie zarodków

Zarodki świni w porównaniu do innych gatunków ssaków są mało podatne na schładzanie i zamrażanie. Zostało to stwierdzone już w pierwszych pracach dotyczących konserwacji zarodków tego gatunku, wykonanych w połowie lat siedemdziesiątych ubiegłego wieku [102, 145]. Mała tolerancja zarodków świni na schładzanie i mrożenie jest spowodowana wysoką zawartością lipidów w cytoplazmie zarodków tego gatunku [102]. Stwierdzono, że podczas schładzania dochodzi do naruszenia integralności wewnątrzkomórkowych lipidów, co jest powodem zniszczenia cytoplazmy i w rezultacie dochodzi do nieodwracalnych zmian degeneracyjnych zarodka [89]. Ponadto w komórkach przetrzymywanych w temperaturze +15°C stwierdzano strukturalne zmiany lipidów [31]. W kolejnych badaniach [92] wykazano, że wrażliwość zarodków świni na ochładzanie uzależniona jest w większym stopniu, niż to ma miejsce u innych gatunków, od stadium rozwoju zarodka. Stwierdzono na przykład, że istnieje znacząca różnica we wrażliwości na niskie temperatury między wylęglą blastocystą a wcześniejszymi stadiami rozwoju zarodka. W innych badaniach [44, 93] wykazano, że wrażliwość na niskie temperatury zależy od tego, czy rozwój zarodka następował *in vitro*, czy *in vivo*. Obserwacje te wykazały, że blastocysty wylęgłe w hodowli *in vitro* są mniej podatne na uszkodzenia w obniżonych temperaturach dodatnich niż blastocysty wylęgłe *in vivo* [93]. Specyficzna wrażliwość zarodków świni na niskie temperatury manifestuje się również ich obniżoną podatnością na kriokonserwację.

Przez długi czas nie udawało się zamrozić zarodków świni, stosując metody pozwalające na skuteczne zamrażanie zarodków bydła, owiec czy kóz. Pierwsze sukcesy, jakie zanotowano w kriokonserwacji zarodków świni, były głównie rezultatem użycia do zamrażania zarodków w odpowiednim stadium rozwoju, tj. ekspandującej lub wylęgłej blastocysty [54, 65]. Procedura zamrażania zakładała kontrolowane wolne schładzanie z szybkością 0,3°C/min i użycie glicerolu jako związku osłaniającego. Jednak efektywność tych pierwszych prób była dość niska, gdyż 9 prosiąt urodzonych w wyniku przeprowadzonych badań uzyskano po transplatacji 77 kriokonserwowanych zarodków [54, 65].

W następnych pracach nad zamrażaniem zarodków świni liczba użytych do doświadczeń zarodków była stosunkowo niska, a przeżywalność zamrożonych zarodków oceniana była jedynie na podstawie ich rozwoju *in vitro* [17, 95].

Ważnym czynnikiem decydującym o efektywności kriokonserwacji jest rodzaj użytego związku osłaniającego. W doświadczeniach nad zamrażaniem zarodków świni stosowano najczęściej glicerol [54, 61, 95], glicerol z dodatkiem lecytyny [61] lub trehalozy [17]. Niebanalnym rozwiązaniem było użycie glicerolu z dodatkiem żółtka jaja kurzego [37], uwieńczone urodzeniem 1 prosięcia po transplatacji 8 kriokonserwowanych zarodków.

W dotychczasowych badaniach nad zamrażaniem zarodków świni, przeprowadzonych – co należy podkreślić – na niezbyt licznym materiale, stwierdzono, że dla efektywnego ich zamrożenia konieczne jest spełnienie kilku podstawowych warunków. Zamrażane winny być blastocysty w stadium bliskim wylęgania. Media stosowane do zamrażania powinny zawierać dodatek białka pod postacią albuminy surowicy bydlęcej. Jako związku osłaniającego powinno się używać 1,5M glicerolu, chociaż nie wyklucza się użycia innych związków osłaniających. Procedura zamrażania powinna obejmować wcześniejsze schła-

dzanie zarodków we fryzerach, od temperatury pokojowej do temperatury posiewania z szybkością wynoszącą 1°C/minutę. Po zainicjowaniu krystalizacji zarodki powinny być zamrażane z szybkością ok. 0,3°C/min do temperatury -35, -38°C przed ich przełożeniem do ciekłego azotu. Rozmrażanie zarodków powinno się przeprowadzać w łaźni wodnej o temperaturze 35-37°C przy użyciu roztworu do usuwania związków osłaniających 0,3-0,5M sacharozy. Zastosowanie sacharozy zmniejsza ryzyko wystąpienia uszkodzeń spowodowanych szkodliwym oddziaływaniem związku osłaniającego, w tym również uszkodzeń natury osmotycznej.

### **Zamrażanie oocytów**

W najniższym stopniu badania z zakresu kriokonserwacji oocytów zwierząt gospodarskich są zaawansowane w odniesieniu do świń, ze względu na specyficzną wrażliwość gamet i zarodków tego gatunku na schładzanie i kriokonserwację. I tak, w badaniach nad wrażliwością oocytów świni na niskie temperatury stwierdzono, że niedojrzałe oocyty otoczone komórkami wzgórka jajonośnego nie przeżywają oziębiania już do temperatury +15°C [23]. Negatywny wpływ niskich temperatur, manifestujący się depolimeryzacją cytoszkieletu, związany jest prawdopodobnie z penetracją związków osłaniających do komórki oocytu [101, 140] lub z ochładzaniem zawartych w cytoplazmie lipidów, które z kolei wpływają destrukcyjnie na strukturę cytoszkieletu [76]. Ta druga hipoteza została potwierdzona w badaniach oocytów świeżych, poddawanych wirowaniu [76]. Stwierdzono mianowicie, że po 48-godzinnej hodowli w zarodkach wirowanych nastąpił ponowny rozdział lipidów w cytoplazmie, natomiast w oocytach zamrażanych po wirowaniu proces rozdziału lipidów był nieodwracalny. Dowodzi to, według autorów powyższych badań, wpływu procesu kriokonserwacji na fizykochemiczne zmiany lipidów obecnych w cytoplazmie oocytów [76].

W kolejnych badaniach potwierdzono większą podatność na zamrażanie oocytów świni dojrzałych w stadium metafazy II niż oocytów niedojrzałych [112]. Wśród badań dotyczących kriokonserwacji oocytów świni, poza poszukiwaniem odpowiednich warunków użycia związków osłaniających [23, 79, 147], podejmowano również próby wykorzystania w procesie zamrażania tzw. substancji antymroźeniowych [26, 53, 114]. Zastosowanie tych związków w kriokonserwacji oocytów i zarodków jest jednym z kierunków badań [2, 39, 53].

### **Witryfikacja zarodków**

Jak już wspomniano, istotny udział w podatności oocytów i zarodków świni na kriokonserwację ma wysoka zawartość tłuszczów. Wiadomo, że poziom ich zawartości zależy od stadium rozwoju, gatunku oraz stanu fizjologicznego. Najwyższy poziom zawartości tłuszczów obserwuje się w zarodkach znajdujących się we wczesnym stadium rozwoju. Spośród gatunków zwierząt gospodarskich najwyższą ich zawartość stwierdza się w oocytach i zarodkach świni [24]. Ponadto, zarodki świni wyprodukowane *in vitro* charakteryzują się większą zawartością lipidów w porównaniu do uzyskanych *in vivo* [113]. Z punktu widzenia kriokonserwacji jest to zjawisko niekorzystne. Zmniejszenie zawartości tłuszczów w oocytach i zarodkach można osiągnąć poprzez ich mikrochirurgiczne usuwanie [91] lub polaryzację lipidów na drodze wirowania [33].

Wyprodukowane *in vitro* zarodki świni charakteryzują się odmienną wrażliwością na schładzanie niż zarodki innych gatunków ssaków. Stwierdzono, co było znacznym zaskoczeniem, że blastocysty świni uzyskane z hodowli *in vitro* są mniej podatne na uszkodzenia w obniżonych temperaturach niż morule lub blastocysty rozwijające się *in vivo* [40, 47].

W ostatnich latach badania z zakresu kriokonserwacji zarodków świni koncentrują się głównie na witrifikacji. Znaczący postęp w rozwoju tej metody został osiągnięty dzięki minimalizacji objętości płynu zawierającego witrifikowany zarodek (tzw. metoda OPS lub SOPS) [134]. Takie postępowanie, pozwalające na uzyskanie wysokiego tempa schładzania w trakcie procesu witrifikacji, umożliwiło, w odniesieniu do zarodków świni, osiągnięcie stosunkowo wysokiej przeżywalności *in vitro* (morula: 14 do 70%, blastocysta: 67 do 73%) [9, 134] oraz *in vivo* (morula: 13%, blastocysta: 55%) [9, 10, 11]. Przeprowadzone badania własne potwierdziły pozytywny wpływ zminimalizowanej objętości witrifikowanej próbki w słómkach OPS na przeżywalność zarodków świni w stadium moruli i blastocysty [43].

Stosowane modyfikacje metody witrifikacji, wykorzystujące wysokie tempo schładzania, to między innymi: metoda kroplowa zastosowana do oocytów [98] i zarodków bydłecych [111] oraz do zarodków świni [88], pętłkowa (CLV, cryoloop vitrification) używana z powodzeniem do zarodków chomika [67] i człowieka [68], metoda z zastosowaniem siateczki mikroskopowej (EM grids) [100], metalowej kostki pokrytej folią aluminiową (SSV, solid surface vitrification) [8], czy schłodzonym poniżej  $-200^{\circ}\text{C}$  ciekłym azotem w urządzeniu Vitmaster [3]. Metody te, chociaż wydają się być dość atrakcyjne, są jednak wykorzystywane do kriokonserwacji zarodków świni w ograniczonym zakresie [4, 25].

Z badań własnych nad witrifikacją zarodków świni wynikało, że blastocysty przeżywały na poziomie około 30%, podczas gdy nie przeżył żaden zarodek w stadium moruli [47]. Obserwacje te potwierdziły badania przeprowadzone wcześniej przez Dobrinskiego i Johnsona [27], którzy wykazali, że 6- i 7-dniowe zarodki świni przeżywały w wyższym stopniu niż zarodki 5-dniowe. Autorzy ci stwierdzili ponadto, że jedna z badanych przez nich mieszanin osłaniających (glicerol i albumina surowicy – V<sub>Sa</sub>) okazała się nietoksyczna niezależnie od wieku traktowanych zarodków. Podobnie w przeprowadzonym doświadczeniu własnym [42] uzyskano 30-40% przeżywalność morul i blastocyst przetrzymywanych w mieszaninie glikolu etylenowego, fikolu i sacharozy (EFS), natomiast w kolejnym doświadczeniu [44] mieszanina EFS okazała się bardziej toksyczna dla wylęgłych niż dla ekspandujących blastocyst, co z kolei znalazło odzwierciedlenie w rezultatach witrifikacji. Doświadczenia nad witrifikacją blastocyst świni przeprowadzone w kolejnych latach wykazały, że mimo osiągania wysokiej przeżywalności *in vitro*, odsetek blastocyst przeżywających *in vivo* był znacznie niższy. Traktując zarodki cytochalazyną B przed procesem witrifikacji [28], czy też stosując metodę OPS [11, 134], wykazano również możliwość efektywnej kriokonserwacji zarodków świni w stadium moruli.

W rezultacie prowadzonych w Dziale Biotechnologii Rozrodu Zwierząt Instytutu Zootechniki PIB badań z zakresu kriokonserwacji zarodków świni uzyskano potomstwo po transplantacji witrifikowanych zarodków [48]. Były to pierwsze w Polsce prosięta uzyskane po transplantacji kriokonserwowanych zarodków świni.



### Witryfikacja oocytów

W badaniach dotyczących witryfikacji niedojrzałych oocytów świni stosowano cytochalazynę B, jako inhibitor polimeryzacji mikrofilamentów aktynowych [35, 59, 60], która specyficznym oddziałuje na elementy cytoszkieletu, wpływając na jego elastyczność, jak również mniejszą podatność lipidów na oziębienie [18]. Z doświadczeń tych wynikało, że po takim traktowaniu oocytów i witryfikacji w mieszaninie glicerolu i surowicy, po rozmrożeniu 21% oocytów osiągało dojrzałość *in vitro* [60]. Znacznie wyższy odsetek dojrzałych oocytów (37%) uzyskano po traktowaniu cytochalazyną B i witryfikacji w glikolu etylenowym, trochę niższy (24%) po identycznym traktowaniu i witryfikacji w mieszaninie glikolu etylenowego i dwumetylosulfotlenku [35]. Na uwagę zasługują również próby zastosowania stabilizatora cytoszkieletu, jakim jest Taxol [36, 118, 128]. Stwierdzono, że Taxol zmienia dynamikę mikrotubuli w oocytach ssaków w stadium GVBD (germinal vesicle breakdown), czyli zaniku otoczki jądrowej pęcherzyka zarodkowego [109]. Na temat korzystnego wpływu dodatku Taxolu na kriokonserwację oocytów świni zdania autorów dwóch wcześniej cytowanych prac [36, 128] są podzielone.

W procesie kriokonserwacji oocytów świni poważną przeszkodą są związki lipidowe. Aby ten problem rozwiązać, stosowane są różne strategie redukcji lub usuwania części lipidów lub całych kropli lipidowych. Najczęściej stosowanymi były metody mikrochirurgiczne [52, 94] lub mechaniczne, z wykorzystaniem wirowania w celu polaryzacji lipidów [99]. Stwierdzono, że oocyty poddane witryfikacji po mikrochirurgicznym usunięciu związków lipidowych mogą być skutecznie zapłodnione *in vitro* i rozwijać się do stadium 8 komórek – moruli [94]. Interesującą metodą usuwania całych kropli lipidowych po wcześniejszym wirowaniu oocytów w hipertonicznym roztworze glukozy zastosowali Hara i wsp. [52], uzyskując wyższą podatność oocytów świni w stadium GV na kriokonserwację w porównaniu do oocytów nie poddawanych takiemu traktowaniu.

Kolejny postęp z punktu widzenia skuteczności metod kriokonserwacji oocytów osiągnięto dzięki zastosowaniu nowych technik, wśród których, jak to już wcześniej zaznaczono, najbardziej znaczące okazały się: witryfikacja w minimalnej objętości próbki w otwartych cienkich słódkach, metoda OPS [133, 139], witryfikacja na powierzchni (ochłodzonej w ciekłym azocie) metalowego bloczku pokrytego folią aluminiową, tzw. metoda SSV [50, 124] lub witryfikacja na cienkiej plastikowej końcówce umieszczonej w specjalnym narzędziu, tzw. cryotop [29, 35]. Metody te przyniosły jednak tylko niewielką poprawę przeżywalności oocytów świni.

Zupełnie innym podejściem do tego problemu jest zastosowanie przed procesem kriokonserwacji wysokiego ciśnienia hydrostatycznego, o którym już wcześniej wspomniano. Powoduje ono „adaptację” komórek na kolejny stres, jakim jest kriokonserwacja, co w konsekwencji może powodować zwiększenie jej efektywności [105]. Próby zastosowania tej technologii do witryfikacji oocytów świni umożliwiły uzyskanie po rozmrożeniu od 1,5 do 15,5% rozwijających się partenogenetycznie blastocyst, w porównaniu do 0,8 do 1,3% w grupach kontrolnych [29, 104]. Wydaje się, że metoda z zastosowaniem wysokiego ciśnienia hydrostatycznego stwarza praktyczne możliwości zwiększenia efektywności kriokonserwacji oocytów świni.

W badaniach własnych, po transplantacji do jajowodów 4 biorczyń 127 dojrzałych *in vivo* oocytów witryfikowanych metodą OPS w mieszaninie glikolu etylenowego i DMSO

z dodatkiem surowicy płodów cielęcych, nie uzyskano ciąży. Natomiast po przeniesieniu do 4 biorczyń 112 dojrzałych oocytów wityfikowanych w mieszaninie związków osłaniających bez dodatku surowicy, w 2 przypadkach stwierdzono ciążę [45]. W wyniku oproszenia uzyskano 12 żywych prosiąt, które poddano testom weryfikacji ich pochodzenia. Pozytywny wynik uzyskano w przypadku 4 prosiąt, co oznacza, że uzyskano jedno z nielicznych prosiąt w świecie urodzone po przeniesieniu wityfikowanych oocytów świni [46]. Badania te potwierdziły wcześniejsze doświadczenia przeprowadzone na zarodkach bydłęcych [108, 131], w których stwierdzono negatywny wpływ dodatku surowicy na przeżywalność zarodków po kriokonserwacji. Autorzy ci sugerują, że w obecności surowicy następuje nadmierna akumulacja lipidów, co z kolei jest przyczyną negatywnego wpływu na podatność oocytów na kriokonserwację.

Reasumując, można zauważyć, że z jednej strony związki tłuszczowe są poważną przeszkodą w procesie kriokonserwacji zarówno zarodków, jak i oocytów, z drugiej strony jednak ich rola w procesach życiowych komórki jako materiału energetycznego i budulcowego jest bardzo ważna. Konieczne są dalsze badania nad poprawą efektywności metod, które będą dawały wyniki bardziej stabilne i powtarzalne, uwzględniające jednak rolę lipidów dla funkcjonowania komórki.

## OWCA

### Zamrażanie zarodków, wityfikacja zarodków

Początkowe badania związane z mrożeniem i rozmrażaniem zarodków owczych opierały się na metodach kriokonserwacji zarodków bydłęcych i były nieznacznie modyfikowane. Pierwsze jagnię po transplantacji mrożonego zarodka urodziło się w 1974 roku w Cambridge, w zespole Willadsena [cyt. za 12], a w 1977 roku w Polsce [122]. Jako związki osłaniające najczęściej używano DMSO [16], glikol etylenowy [86], glicerol [21] i metanol [22]. W badaniach dowiedziono, że glikol etylenowy jest lepszym i znacznie mniej toksycznym dla zarodków owczych związkiem osłaniającym niż DMSO [16]. Wysoki odsetek przeżywalności *in vivo* i *in vitro* zarodków owczych (73%) uzyskano stosując metodę kontrolowanego mrożenia, w której wykorzystano 1,5M glikol etylenowy oraz 1 M roztwór sacharozy do rozmrażania. Ponadto stwierdzono, że kriokonserwacja z zastosowaniem glikolu etylenowego była efektywniejsza w przypadku zarodków uzyskanych *in vivo* [83]. Natomiast w badaniach Songsasena i wsp. [125] wykazano, że można uzyskać żywe potomstwo po przeniesieniu mrożonych zarodków owczych zarówno w stadium moruli, jak i blastocysty.

Oprócz standardowej metody mrożenia, w przypadku owiec przeprowadzano również próby wityfikacji zarodków. Odpowiednio zmodyfikowane procedury tej metody kriokonserwacji mogą stanowić alternatywę dla obecnych metod zamrażania i być z powodzeniem wykorzystywane, np. do zabezpieczenia rezerwy genetycznej zanikających ras owiec [62, 144], podobnie jak w przypadku bydła rasy polskiej czerwonej [144] czy niektórych ras i linii królików [121]. Wydaje się, że kriokonserwacja metodą wityfikacji może być również przydatna w przypadku zarodków o większej wrażliwości na schładzanie, takich jak zarodki wyprodukowane *in vitro*, klonowane lub poddane manipulacjom, np. biopsji [19].

Ważnymi czynnikami, które mogą wywierać wpływ na wyniki przeżywalności witrifikowanych zarodków owczych są: skład mieszaniny witrifikacyjnej, metoda przeniesienia zarodków (bezpośrednia lub tradycyjne rozmrażanie wraz z oceną morfologiczną zarodków po rozmrożeniu lub/i hodowlą), stan fizjologiczny zarodka (uzyskane *in vitro* lub *in vivo*) czy też metody hodowli.

Pierwsze udane próby witrifikacji zarodków owczych przeprowadzili Gajda i wsp. [49], Széll i wsp. [130], Martinez i Matkovic [82] oraz Ptak i wsp. [107]. Zastosowana przez Gajdę i wsp. [49] procedura witrifikacji, opierająca się na użyciu mieszaniny glicerolu i propandiolu, pozwoliła uzyskać przeżywalność *in vivo* porównywalną z przeżywalnością zarodków zamrażanych. Możliwość pełnego rozwoju *in vivo* witrifikowanych zarodków owczych uwarunkowana była przeniesieniem zarodków do biocryń bezpośrednio (do 2 min) po rozmrożeniu i usunięciu środka osłaniającego. W kolejnych pracach badano różne rodzaje mieszanin witrifikacyjnych, takie jak: glikol etylenowy i glicerol [83] lub glikol etylenowy i 1M roztwór sacharozy [1]. W wyniku zastosowania pierwszej z wymienionych mieszanin witrifikacyjnych uzyskano 52% ciąży po witrifikacji 6-dniowych blastocyst [83]. W badaniach Mermillod'a i wsp. [87] odsetek wykoceń macioerek uzyskany po przeniesieniu blastocyst świeżych lub witrifikowanych był podobny (odpowiednio 60% i 50%), gdy zastosowano hodowlę zarodków po rozmrożeniu. Natomiast wyższy odsetek samic ciężarnych (81%) obserwowano w przypadku bezpośredniego przeniesienia zarodków kriokonserwowanych [83]. W następnych badaniach [cyt. za 19] potwierdzone zostały obserwacje przeprowadzone przez Gajdę i wsp. [49] oraz Barila i wsp. [7], że bezpośrednie przeniesienie zarodków owczych do biocryń zwiększa odsetek ciężarnych samic. Takie postępowanie prawdopodobnie wyklucza negatywny wpływ związany z subiektywną selekcją zarodków po rozmrożeniu czy też hodowli *in vitro* [19].

Innym kryterium decydującym o przeżywalności kriokonserwowanych zarodków owczych jest sposób ich uzyskiwania. Jak wiadomo, istnieją znaczące różnice w budowie struktur komórkowych i procesach biochemicznych między zarodkami uzyskanymi *in vivo* i *in vitro*, a to skutkuje ich różną podatnością na procesy kriokonserwacji. Również pożywki o niezdefiniowanym składzie oraz metody hodowli zarodków stosowane przez różnych autorów mogą przyczyniać się do wzrostu wrażliwości na schładzanie zarodków uzyskanych pozaustrojowo, a tym samym mogą wpływać na wyniki przeżywalności kriokonserwowanych zarodków owczych [19].

Niektóre modyfikacje techniki witrifikacji, m.in. wykorzystujące słomki typu OPS, pozwalają uzyskać wysoki odsetek przeżywalności zarodków owczych zarówno *in vitro*, jak i *in vivo* [19, 26]. Należy również zasygnalizować problem, podnoszony przez niektórych autorów [132], związany z urodzeniem jagniąt z wadami budowy lub o większej masie ciała po przeniesieniu zarodków uzyskanych *in vitro* i kriokonserwowanych niż po przeniesieniu zarodków świeżych.

### **Zamrażanie oocytów, witrifikacja oocytów**

Kriokonserwacja oocytów owiec, podobnie jak innych gatunków, wciąż napotyka wiele trudności i wymaga optymalizacji stosowanych metod. Istnieje wiele czynników wpływających na przeżywalność kriokonserwowanych oocytów owczych. Jednym z głównych problemów jest ich wysoka wrażliwość na procesy zamrażania. Wykazano, że niedojrzałe

oocyty pozbawione komórek wzgórka jajonośnego (cumulus oophorus) i następnie poddane witrifikacji wykazywały wyższy odsetek przeżywalności i lepsze kompetencje rozwojowe niż oocyty posiadające wspomniane komórki [14]. Natomiast w innych badaniach [148] nie zaobserwowano wpływu obecności komórek wzgórka jajonośnego na przeżywalność dojrzałych oocytów owczych po witrifikacji metodą SSV.

Kolejnym czynnikiem, który może wpływać na przeżywalność oocytów poddanych mrożeniu jest wstępna inkubacja z zastosowaniem cytochalazyny B (CB). Silvestre i wsp. [119], stosując dodatek CB do witrifikacji oocytów owczych nie obserwowali jego wpływu na osiąganie przez oocyty dojrzałości po rozmrożeniu. Natomiast Bogliolli i wsp. [14] wykazali, że CB może negatywnie wpływać na przeżywalność niedojrzałych oocytów. Badania Zhang'a i wsp. [148] dowiodły, że obecność cytochalazyny B wpływa pozytywnie na oocyty dojrzałe i pozwala zmniejszyć uszkodzenia powstające w trakcie procesu mrożenia. Najlepsze efekty uzyskiwano stosując dodatek CB o stężeniu 7,5 i 10 µg/ml roztworu.

Czynnikiem wpływającym na przeżywalność i kompetencje rozwojowe oocytów jest także metoda ich kriokonserwacji. Porównując konwencjonalne metody zamrażania z witrifikacją techniką SSV i cryotop, najlepsze wyniki uzyskano stosując dwie wspomniane modyfikacje witrifikacji [30]. Ponadto oocyty poddane witrifikacji metodą SSV wykazywały najwyższą przeżywalność oraz posiadały niezmiennione mitochondria i zachowaną strukturę ooplazmy [30].

## KOZA

### Zamrażanie zarodków, witrifikacja zarodków

Znacznie mniej prac poświęconych jest problemowi kriokonserwacji zarodków i oocytów kozy. Podobnie jak w przypadku owiec, metoda zamrażania opiera się na dotychczas opracowanych technikach kriokonserwacji zarodków bydłęcych.

Na podstawie dostępnej literatury można stwierdzić, że kriokonserwowane zarodki kozy wykazują wyższą przeżywalność niż zarodki owcy poddane tym samym procedurom mrożenia i rozmrażania. W badaniach Traldi i wsp. [132] porównywano odsetek ciężarnych kóz i owiec, po transplantacji z wykorzystaniem zarodków świeżych lub witrifikowanych w mieszaninie glicerolu i glikolu etylenowego. Uzyskany odsetek samic ciężarnych po przeniesieniu wyprodukowanych *in vitro*, kriokonserwowanych zarodków kóz i owiec wynosił odpowiednio 60% i 41%, natomiast zarodków uzyskanych *in vivo* – 45% i 15% [cyt. za 19, 132].

Jednym z decydujących czynników mających wpływ na przeżywalność kriokonserwowanych zarodków kozich jest ich stadium rozwoju [75]. Najwyższy odsetek przeżywalności kriokonserwowanych zarodków wykazano w przypadku blastocyst ekspandujących, wylęgających i wylęgłych oraz użyciu jako związku osłaniającego DMSO lub glicerolu [83]. Badania Li i wsp. [75] nie wykazały istotnych różnic w odsetku samic ciężarnych po przeniesieniu zarodków świeżych oraz poddanych mrożeniu (odpowiednio 60% i 59%). Ponadto wykazano, że istnieje możliwość urodzenia się żywych kozłąt po przeniesieniu zarodków wyprodukowanych pozaustrojowo i kriokonserwowanych [26].

Badania porównawcze przeżywalności zarodków kozich kriokonserwowanych metodą mrożenia i witrifikacji w słomkach OPS, wykazały wyższy odsetek przeżywalności zarodków witrifikowanych [32].

### **Zamrażanie oocytów, witryfikacja oocytów**

W nielicznych badaniach [70] nad wpływem kriokonserwacji na dojrzewanie *in vitro* oocytów kozy wykazano, że proces witryfikacji wpływał negatywnie na ich dojrzewanie, a obecność związku osłaniającego w postaci propandiolu w znacznym stopniu obniżała odsetek oocytów zapłodnionych, co mogło wynikać z jego szkodliwego działania.

W kolejnych badaniach stwierdzono przydatność do witryfikacji oocytów kozy zarówno techniki SSV, jak i CLV [110]. Ponadto wykazano, że substancje osłaniające wykorzystywane w obu technikach witryfikacji nie były toksyczne dla dojrzewających i podejmujących rozwój oocytów oraz zarodków kozy. Jednakże żaden z witryfikowanych oocytów po zapłodnieniu nie rozwinął się do stadium blastocysty.

Innym badaniem czynnikiem mogącym wpływać na przeżywalność i odsetek zapłodnionych oocytów jest obecność komórek wzgórka jajonośnego podczas kriokonserwacji. Stwierdzono, że witryfikowane niedojrzałe oocyty pozbawione komórek wzgórka wykazują niższą przeżywalność i niższy ich odsetek zachowuje prawidłową budowę morfologiczną w porównaniu do oocytów nie pozbawionych tych komórek. Wykazano ponadto, że niedojrzałe oocyty kozy lepiej niż dojrzałe znoszą proces kriokonserwacji [110].

## **KOŃ**

### **Zamrażanie zarodków, witryfikacja zarodków**

Kriokonserwacja zarodków koni wciąż jest problem nierozwiązanym, ze względu na wysokie koszty badań. Na świecie pozyskuje się niewiele zarodków końskich, jak również mało jest doniesień o przeprowadzanych przeniesieniach zarodków. Dodatkowym czynnikiem ograniczającym pozyskanie większej liczby zarodków jest brak możliwości wywołania u kłaczy superowulacji. Natomiast występowanie charakterystycznego tworzy w postaci kapsuły, która tworzy się we wczesnym stadium zarodkowym [26, 83, 127], może upośledzać przenikanie substancji krioosłaniającej do wnętrza zarodka i tym samym obniżać jego podatność na zamrażanie [83, 127]. W przeciwieństwie do innych gatunków ssaków, u koni zaobserwowano występowanie indywidualnej, zmiennej tolerancji zarodków na metody kriokonserwacji [26]. Ważnym czynnikiem ograniczającym rozwój metod kriokonserwacji oocytów i zarodków koni są także kwestie prawne, dotyczące wpisu do ksiąg rejestracyjnych źrebaków większości ras urodzonych z kriokonserwowanych zarodków [127].

Pierwsze źrebięta po przeniesieniu zarodków zamrożonych w ciekłym azocie uzyskano dopiero na początku lat osiemdziesiątych ubiegłego wieku. Kolejnego udanego eksperymentu konserwacji zarodków kłaczy w ciekłym azocie i urodzenia się źrebięcia dokonano podczas międzynarodowej wymiany między Polską a Anglią w 1985 roku [15].

Z przeglądu wcześniejszych prac dotyczących kriokonserwacji zarodków koni wynika, że początkowo stosowano metody kontrolowanego mrożenia, bazujące na technikach kriokonserwacji innych gatunków ssaków [116]. Jednak metody te nie przynosiły zadowalających rezultatów przeżywalności zarodków i tym samym nie zostały wdrożone do komercyjnych programów przenoszenia zarodków. W późniejszych badaniach [117] do kriokonserwacji zarodków koni zastosowano metodę witryfikacji w słomkach OPS.

U koni do kriokonserwacji przeznaczają się zarodki w 6. dniu po owulacji [83, 127]. Pierwszego źrebaka z poddanego kriokonserwacji 6-dniowego zarodka uzyskał w 1982 roku zespół Yamamoto i wsp. [cyt. za 127]. W przypadku tego gatunku, o przeżywalności zarodków poddanych kriokonserwacji decydują głównie wielkość i stadium rozwoju. Dowodem na to mogą być wyniki badań Lascombese i Pashena [69], którzy zamrażając zarodki o wielkości mniejszej niż 220  $\mu\text{m}$  uzyskali wskaźnik zażrebień na poziomie 56%. Próby kriokonserwacji zarodków koni w stadium moruli lub blastocysty wykazały, że im wyższa szybkość zamrażania (0,3 do 0,5°C/min), tym lepsza przeżywalność zarodków [26]. Optymalnym związkami osłaniającymi, w przypadku koni, okazały się glicerol [20, cyt. za 83 i 127]. Natomiast procedura zamrażania i rozmrażania zarodków jest identyczna, jak stosowana dla zarodków bydlęcych [cyt. za 83]. Modyfikacje tych technik (np. dodatek 100 mM L-glutaminy do roztworu glicerolu) pozwoliły uzyskać odsetek ciąży na poziomie 50% [cyt. za 83 i 127].

Badając wpływ wielkości blastocyst na ich przeżywalność po witrifikacji [57] przy zastosowaniu mieszaniny witrifikacyjnej EFS wykazano, że wraz ze zwiększaniem zarodka spada jego przeżywalność. W innych badaniach [71] starano się określić wpływ obecności kapsuły na szybkość przenikania substancji osłaniających do zarodka klaczy. W badaniach tych stwierdzono, że po nadtrawieniu kapsuły związkami enzymatycznymi substancja osłaniająca lepiej penetruje zarodek. Technika ta znalazła zastosowanie w przypadku kriokonserwacji zarodków większych niż 220  $\mu\text{m}$ , które bez traktowania enzymatycznego wykazywały niską przeżywalność [127].

#### Zamrażanie oocytów, witrifikacja oocytów

W przypadku oocytów koni pierwsze próby ich kriokonserwacji z użyciem glikolu etylenowego jako substancji osłaniającej nie przyniosły zadowalających rezultatów [126]. Uzyskiwany odsetek oocytów przeżywających wynosił 16% i 17%, odpowiednio dla kontrolowanego mrożenia oraz witrifikacji. Podjęte próby oceny wpływu stopnia dojrzałości oocytu po kriokonserwacji [56] wykazały niższą przeżywalność zarówno niedojrzałych, jak i dojrzałych oocytów klaczy w porównaniu do oocytów bydlęcych poddanych witrifikacji z użyciem słomek OPS [126]. Ponadto wykazano, że dojrzałe oocyty klaczy lepiej znoszą proces zamrażania niż niedojrzałe. Najlepszym związkiem osłaniającym w kriokonserwacji oocytów klaczy okazał się glikol etylenowy [126]. Również zastosowanie modyfikacji metody witrifikacji, takich jak CLV i OPS, wyraźnie poprawiało wskaźniki przeżywalności oocytów koni [126].

Niezadowalające wskaźniki żrebności, uzyskiwane po przeniesieniu zarodków uzyskanych z kriokonserwowanych oocytów, dowodzą, że procedury konserwacji oocytów koni w niskich temperaturach wymagają dalszych badań [96, 126].

#### PIŚMIENNICTWO

1. ALI J., SHELTON J.N., 1993 – Design of vitrification solutions for the cryopreservation of embryos. *Journal of Reproduction and Fertility* 99, 65-70.
2. ARAV A., RUBINSKY B., FLETCHER G., SEREN E., 1993 – Cryogenic protection of oocytes with antifreeze proteins. *Molecular Reproduction and Development* 36, 488-493.

3. ARAV A., YAVIN S., ZERON Y., NATAN D., DEKEL I., GACITUA H., 2002 – New trends in gamete's cryopreservation. *Molecular and Cellular Endocrinology* 187, 77-81.
4. ARAV A., ZERON Y., OCHERETNY A., 2000 – A new device and method for vitrification increases the cooling rate and allows successful cryopreservation of bovine oocytes. *Theriogenology* 53, 248.
5. AVERY B., SCHMIDT M., GREVE T., 1992 – Cryopreservation of in vitro produced bovine oocytes. Proceeding 12<sup>th</sup> International Congress Animal Reproduction, The Hague 3, 1421.
6. BARCELO-FIMBRES M., SEIDEL G. JR., 2006 – Effect of fetal calf serum or phenazine ethosulfate and fructose or glucose on embryonic development and lipid accumulation of bovine embryos. *Reproduction Fertility and Development* 18, 186.
7. BARIL G., TRALDI A.L COGNIE Y., LEBOEUF B., BECKERS J.F., MERMILLOD P., 2001 – Successful direct transfer of vitrified sheep embryos. *Theriogenology* 56, 299-305.
8. BEEBE L.F.S., BOUWMAN E.G., MC ILFATRICK S.M., NOTLE M.B., 2011 – Piglets produced from in vivo blastocyst vitrified using the Cryologic Vitrification Method (solid surface vitrification) and sealed storage container. *Theriogenology* 75, 1453-1458.
9. BERTHELOT F., MARTINAT-BOTTE F., LOCATELLI A., PERREAU C., TERQUI M., 2000 – Piglets born after vitrification of embryos using the open pulled straw method. *Cryobiology* 41, 1116-1124.
10. BERTHELOT F., MARTINAT-BOTTE F., PERREAU C., TERQUI M., 2001 – Birth of piglets after OPS vitrification and transfer of compacted morula stage embryos with intact zona pellucida. *Reproduction Nutrition Development* 41, 267-272.
11. BERTHELOT F., MARTINAT-BOTTE F., VENTURI E., FURSTOSS V., COGNIE J., 2007 – Development of OPS vitrified pig blastocysts: effects of size of the collected blastocysts, cryoprotectant concentration used for vitrification and number of blastocysts transferred. *Theriogenology* 68, 178-185.
12. BIELAŃSKI A., TISCHNER M., 1997 – Biotechnologia Rozrodu Zwierząt Udomowionych. Wydawnictwo Drukrol, Kraków. Rozdział 3: Owce, 251-319.
13. BILTON R.J., MOORE N.W., 1979 – Factors affecting the viability of frozen stored cattle embryos. *Journal of Biological Sciences* 32, 101.
14. BOGLIOLIO L., ARIU F., FOIS S., ROSATI I., ZEDDA M.T., LEONI G., SUCCU S., PAU S., LEDDA S., 2007 – Morphological and biochemical analysis of immature ovine oocytes vitrified with or without cumulus cells. *Theriogenology* 8, 1138-1149.
15. BOYLE M.S., ALLEN W.R., TISCHNER M., CZŁONKOWSKA M., 1985 – Storage and international transport of horse embryos in liquid nitrogen. *Equine Veterinary Journal*, Supplement 3, 36-39.
16. BRACKE C., NIEMANN H., 1995 – New aspects in the freezing of embryos from livestock. In: Proceeding 11<sup>th</sup> Scientific Meeting of European Embryo Transfer Association. Lyon, France, 101-111.
17. CAMERON R.D.A., LISING R., NAGASHIMA H., BLACKSHAW A.W., 1992 – Cryopreservation of cultured and uncultured porcine embryos with glycerol and trehalose. In: Proceeding 12<sup>th</sup> International Congress on Pig Vet Soc, The Hague, 476.
18. CASELLA J., FLANAGAN M., LIN S., 1981 – Cytochalasin D inhibits actin polymerization and induces depolymerization of actin filaments formed during platelet shape change. *Nature* 293, 302-305.

19. COGNIE Y., BARIL G., POULIN N., MERMILLOD P., 2003 – Current status of embryo technologies in sheep and goat. *Theriogenology* 59, 171-188.
20. CZŁONKOWSKA M., BOYLE M.S., ALLEN W.R., 1985 – Deep freezing of horse embryos. *Journal of Reproduction and Fertility* 75, 485-490.
21. CZŁONKOWSKA M., PAPIS K., GUSZKIEWICZ A., KOSSAKOWSKI M., 1992 – Survival of agar-protected sheep demi-embryos after freezing. *Cryoletters* 13, 293-296.
22. CZŁONKOWSKA M., PAPIS K., GUSZKIEWICZ A., KOSSAKOWSKI M., EYSYMONT U., 1991 – Freezing of sheep embryos in 3.0 M methanol. *Cryoletters* 12, 11-16.
23. DIDION B.A., POMP D., MARTIN M.J., HOMANICS G.E., MARKERT C.L., 1990 – Observations on the cooling and cryopreservation of pig oocytes at the germinal vesicle stage. *Journal of Animal Science* 68, 2803-2810.
24. DOBRINSKY J.R., 1997 – Cryopreservation of pig embryos. *Journal of Reproduction and Fertility*, Supplements 52, 301-312.
25. DOBRINSKY J.R., 2001 – Cryopreservation of pig embryos: adaptation of vitrification technology for embryo transfer. *Reproduction*, Supplements 58, 325-333.
26. DOBRINSKY J.R., 2002 – Advancements in cryopreservation of domestic animal embryos. *Theriogenology* 57, 285-302.
27. DOBRINSKY J.R., JOHNSON L.A., 1994 – Cryopreservation of porcine embryos by vitrification: A study of in vitro development. *Theriogenology* 42, 25-35.
28. DOBRINSKY J.R., PURSEL V.G., LONG C.R., JOHNSON L.A., 2000 – Birth of piglets after transfer of embryos cryopreserved by cytoskeleton stabilization and vitrification. *Biology of Reproduction* 62, 564-570.
29. DU Y., PRIBENSZKY C.S., MOLNAR M., ZHANG X., YANG H., KUWAYAMA M., PEDERSEN A.M., VILLEMOES K., BOLUND L., VAJTA G., 2008 – High hydrostatic pressure: a new way to improve in vitro developmental competence of porcine matured oocytes after vitrification. *Reproduction* 135, 13-17.
30. EBRAHIMI B., VALOJERDI M.R., EFTEKHARI-YAZDI P., BAHARVAND H., 2012 – Ultrastructural changes of sheep cumulus-oocyte complexes following different methods of vitrification. *Zygote* 20, 103-115.
31. EDDIDIN M., PETIT V.A., 1977 – The effect of temperature on the lateral diffusion of plasma membrane proteins. *Ciba Foundation Symposium* 52, 155-174.
32. EL-GAYAR M., HOLTZ W., 2001 – Technical note: Vitrification of goat embryos by the open pulled-straw method. *Journal of Animal Science* 9, 2436-2438.
33. ESAKI R., UEDA H., KUROMI M., HIRAKAWA K., TOMII R., YOSHIOKA H., USHIJIMA H., KUWAYAMA M., NAGASHIMA H., 2004 – Cryopreservation of porcine embryos derived from in vitro-matured oocytes. *Biology of Reproduction* 71, 432-437.
34. FRANKS G.C., COLEY S.L., BETTERBED B., PAGE R.D., 1985 – The effects of cryoprotective agents, dilution rates, freezing rates, and freezing units on the survival of bovine embryos. *Theriogenology* 23, 194.
35. FUJIHIRA T., KISHIDA R., FUKUI Y., 2004 – Developmental capacity of vitrified immature porcine oocytes following ICSI: effects of cytochalasin B and cryoprotectants. *Cryobiology* 49, 286-290.
36. FUJIHIRA T., NAGAI H., FUKUI Y., 2005 – Relationship between equilibration times and the presence of cumulus cells, and effect of taxol treatment for vitrification of in vitro matured porcine oocytes. *Cryobiology* 51, 339-343.



37. FUJINO Y., UJISATO Y., ENDO K., TOMIZUKA T., KOJIMA T., OGURI N., 1993 – Cryoprotective effect of egg yolk in cryopreservation of porcine embryos. *Cryobiology* 30, 299-305.
38. FUKU E., KOJIMA T., SHIOYA Y., MARCUS G.J., DOVNEY B.R., 1992 – In vitro fertilization and development of frozen-thawed bovine oocytes. *Cryobiology* 29, 485-492.
39. FULLER B.J., 2004 – Cryoprotectants: the essential antifreezes to protect life in the frozen state. *Cryoletters* 25, 375-388.
40. GAJDA B., KAŃSKA L., SMORAŃ Z., 2000 – Effect of equilibration time and developmental stage on viability after vitrification of in vitro and in vivo produced bovine embryos. *Annals of Animal Science* 27, 2, 73-78.
41. GAJDA B., SMORAŃ Z., 1998 – Kriokonserwacja oocytów i zarodków ssaków. *Biotechnologia* 2, 41, 10-32.
42. GAJDA B., SMORAŃ Z., 2000 – Survival of pig morula and blastocyst after exposure to vitrification media or vitrification. *Cryoletters* 4, 231-236.
43. GAJDA B., SMORAŃ Z., 2001 – Efektywność witrifikacji zarodków świńskich w zależności od objętości kriokonserwowanej próbki. Mat. „II Zjazdu TBR”, Warszawa, IV-4, 43-44.
44. GAJDA B., SMORAŃ Z., 2002 – Vitrification of cultured and non-cultured expanded and hatched blastocysts. *Cryoletters* 23, 385-388.
45. GAJDA B., SMORAŃ Z., 2010 – Pregnancy after transfer of pig matured oocytes vitrified using ops method. Mat. Konf. TBR „Centralne i Lokalne Regulacje Procesów Rozrodczych”, Zakopane, 21.
46. GAJDA B., SMORAŃ Z., 2010 – Normal piglets born after transfer of pig matured oocytes vitrified using ops method. Proc. of 26<sup>th</sup> AETE Conference, Kuopio, Finland, 152.
47. GAJDA B., SMORAŃ Z., KAŃSKA L., 2000 – Witrifikacja jako metoda kriokonserwacji zarodków króliczych, świńskich i bydłęcych. *Roczniki Naukowe Zootechniki*, Supplement 5, 241-245.
48. GAJDA B., SMORAŃ Z., WIECZOREK J., 2004 – Prosięta uzyskane po transplantacji witrifikowanych blastocyst. *Medycyna Weterynaryjna* 60, 4, 371-373.
49. GAJDA B., SMORAŃ Z., WIERZBOWSKI S., JURA J., WIECZOREK J., 1989 – Transfer of vitrified sheep morula. *Reproduction in Domestic Animals* 24, 97-100.
50. GUPTA M.K., UHM S.J., LEE H.T., 2007 – Cryopreservation of immature and in vitro matured porcine oocytes by solid surface vitrification. *Theriogenology* 67, 238-248.
51. HAMANO S., KOIKEDA A., KUWAYAMA M., NAGAI T., 1992 – Full-term development of in vitro-matured, vitrified and fertilized bovine oocytes. *Theriogenology* 38, 1085-1090.
52. HARA K., ABE Y., KUMADA N., AONO N., KOBAYASHI J., MATSUMOTO H., SASADA H., SATO E., 2005 – Extrusion and removal of lipid from the cytoplasm of porcine oocytes at the germinal vesicle stage: centrifugation under hypertonic conditions influences vitrification. *Cryobiology* 50, 216-222.
53. HARDING M.M., ANDERBERG P.I., HAYMET A.D.J., 2003 – ‘Antifreeze’ glycoproteins from polar fish. *Journal of Biochemistry* 270, 1381-1392.
54. HAYASHI S., KOBAYASHI K., MIZUNO J., SAITHI K., HIRANO S., 1989 – Birth of piglets from frozen embryos. *Veterinary Record* 125, 43-44.
55. HEYMAN Y., SMORAŃ Z., KAŃSKA L., VINCENT C., 1986 – Influence of carbohydrates, cooling and rapid freezing on viability of bovine non-matured oocytes or 1-cell fertilized eggs. *Cryoletters* 7, 170-183.

56. HOCHI S., FUJIMOTO T., CHOI Y., BRAUN J., OGURI N., 1994 – Cryopreservation of equine oocytes by 2-step freezing. *Theriogenology* 42, 1085-1094.
57. HOCHI S., FUJIMOTO T., OGURI N., 1995 – Large equine blastocysts are damaged by vitrification procedures. *Reproduction Fertility and Development* 1, 113-117.
58. HORVARTH G., SEIDEL G.E., 2006 – Vitrification of bovine oocytes after treatment with cholesterol-loaded methyl-beta-cyclodextrin. *Theriogenology* 66, 1026-133.
59. ISACHENKO V., 1997 – Vitrification of porcine immature oocytes: new aspect. *Problems of Cryobiology* 1-2, 100-110.
60. ISACHENKO V., PEREZ-SANCHEZ F., ISACHENKO E., GRISHCHENKO V., SOLER C., 1998 – Vitrification of immature porcine oocytes: effects of lipid droplets, temperature, cytoskeleton, and addition and removal of cryoprotectant. *Cryobiology* 36, 250-253.
61. KAMEYAMA K., TAKEDOMI T., ITAKURA H., ONIHARA T., 1990 – Effect of lecithin on cryopreservation of porcine embryos. In: Proc. „The 78th Annals Conference Japan Society Animal Reproduction”, pp. 22.
62. KARETA W., WIERZCHOŚ E., SMORAĞ Z., GAJDA B., KRUPIŃSKI J., 1983 – Zabezpieczenie rezerwy genetycznej zanikającej owcy świniarkopodobnej przez zamrażanie zarodków i nasienia. Mat. VII Kongresu PTNW, Lublin, 872-873.
63. KASAI M., KOMI J.A., TAKHAMO A., TSUDERA H., SAKURAI T., MACHIDA T., 1990 – A Simple method for mouse embryo cryopreservation in low toxicity vitrification solution without appreciable loss of viability. *Journal Reproduction and Fertility* 89, 91.
64. KASAI M., MUKAIDA T., 2004 – Cryopreservation of animal and human embryos. *Reproductive Biomedicine Online* 9, 2, 164-170.
65. KASHIWAZAKI N., OHTANI S., MIYAMOTO K., OGAWA S., 1991 – Production of normal piglets from hatched blastocysts frozen at –196 degrees C. *Veterinary Record* 128, pp. 256.
66. KUWAYAMA M., HAMANO S., NAGAI T., 1992 – Vitrification of bovine blastocysts obtained by in vitro culture of oocytes matured and fertilized in vitro. *Journal of Reproduction and Fertility* 96, 187-193.
67. LANE M., FOREST K.T., LYONS E.A., BAVISTER B.D., 1999 – Containerless vitrification of mammalian oocytes and embryos. *Theriogenology* 51, pp. 167.
68. LANE M., SCHOOLCRAFT W.B., GARDNER D.K., 1999 – Vitrification of mouse and human blastocysts using a novel cryoloop container-less technique. *Fertility and Sterility* 72, 1073-1078.
69. LASCOMBES F.A., PASHEN R.L., 2000 – Results from embryo freezing and post-ovulation breeding in a commercial embryo transfer program. In: Proc. of the 5th International Symposium on Equine Embryo Transfer. *Havemeyer Foundation Monograph Series* 3, 95-96.
70. LE GAL F., 1996 – In vitro maturation and fertilization of goat oocytes frozen at the germinal vesicle stage. *Theriogenology* 45, 1177-1185.
71. LEGRAND E., KRAWIECKI J.M., TAINTURIER D., CORNIERE P., DELAJARRAUD H., BRUYAS J.F., 2000 – Does the embryonic capsule impede the freezing of equine embryos? In: Proc. of the 5th International Symposium on Equine Embryo Transfer. *Havemeyer Foundation Monograph Series* 3, 62-65.
72. LEHN-JENSEN H., GREVE T., 1980 – Preservation of bovine blastocysts in liquid nitrogen using two different freezing/thawing rates and DMSO/glycerol as cryoprotectants. *Theriogenology* 13, 100.

73. LEIBO S.P., LOSKUTOFF N.M., 1993 – Cryobiology of in vitro-derived bovine embryos. *Theriogenology* 39, 81-94.
74. LEIBO S.P., MARTINO A., KOBAYASHI S., POLLARD J.W., 1996 – Stage-dependent sensitivity of oocytes and embryos to low temperatures. *Animal Reproduction Science* 42, 45-53.
75. LI R., CAMERON W.N., BATT P.A., TROUNSON A.O., 1990 – Maximum survival of frozen goat embryos is attained at the expanded, hatching and hatched blastocyst stages of development. *Reproduction Fertility and Development* 2, 345-350.
76. LIEBERMANN J., NAWROTH F., ISACHENKO V., ISACHENKO E., RAHIMI G., TUCKER M.J., 2002 – Potential importance of vitrification in reproductive medicine. *Biology of Reproduction* 67, 1671-1680.
77. LIM J.M., FUKUI Y., ONO H., 1991 – The post-thaw developmental capacity of frozen bovine oocytes following in vitro maturation and fertilization. *Theriogenology* 35, 1225-1235.
78. LIN L., KRAGH P.M., PURUP S., KUWAYAMA M., DU Y., ZHANG X., YANG H., BOLUND L., CALLESEN H., VAJTA G., 2009 – Osmotic stress induced by sodium chloride, sucrose or trehalose improves cryotolerance and developmental competence of porcine oocytes. *Reproduction Fertility and Development* 21, 2, 338-344.
79. LIU R.H., SUN Q.Y., JIAO L.H., WANG W.H., 2003 – Maturation of porcine oocytes after cooling at the germinal vesicle stage. *Zygote* 11, 299-305.
80. LOPEZ-GATIUS F., CAMON-URGEL J., 1989 – Pregnancies and live offspring following transfer of one-step vitrified bovine embryos. *Zuchthygiene* 24, 255.
81. MAHMOUDZADEH A.R., VAN SOOM A., VAN VLAENDEREN I., DE KRUIF A., 1993 – A comparative study of the effect of one-step addition of different vitrification solutions on in vitro survival of vitrified bovine embryos. *Theriogenology* 39, 1291.
82. MARTINEZ A.G., MATKOVIC M., 1998 – Cryopreservation of ovine embryos: Flow freezing and vitrification. *Theriogenology* 49, 1039-1049.
83. MASSIP A., 2001 – Cryopreservation of embryos of farm animals. *Reproduction in Domestic Animals* 36, 49-55.
84. MASSIP A., VAN DER ZWALMEN P., ECTORS F., 1987 – Recent progress in cryopreservation of cattle embryos. *Theriogenology* 27, 1, 69-78.
85. MASSIP A., VAN DER ZWALMEN P., SCHEFFEN B., ECTORS F., 1986 – Pregnancies following transfer of cattle embryos preserved by vitrification. *Cryoletters* 7, 270-273.
86. MCGINNIS L.K., DUPLANTIS S.C.JR., YOUNGS C.R., 1993 – Cryopreservation of sheep embryos using ethylene glycol. *Animal Reproduction Science* 30, 273-280.
87. MERMILLOD P., TRALDIA L., BARIL G., BECKERS J.F., MASSIP A., COGNIE Y., 1999 – A vitrification method for direct transfer of sheep embryos. Proc. 15<sup>th</sup> Annual Meeting of the AETE, Lyon, France, p. 212.
88. MISUMI K., SUZUKI M., SATO S., SAITO N., 2003 – Successful production of piglets derived from vitrified morulae and early blastocysts using a microdroplet method. *Theriogenology* 60, 253-260.
89. MOHR I.R., TROUNSON A.O., 1981 – Structural changes associated with freezing of bovine embryos. *Biology of Reproduction* 25, 1009-1025.
90. MULLEN S.F., FAHY G.M., 2012 – A chronologic review of mature oocyte vitrification research in cattle, pigs, and sheep. *Theriogenology* 78, 1709-1719.

91. NAGASHIMA H., KASHIWAZAKI N., ASHMAN R.J., GRUPEN C.G., SEAMARK R.F., NOTTLE M.B., 1994 – Removal of cytoplasmic lipid enhances the tolerance of porcine embryos to chilling. *Biology of Reproduction* 51, 618-622.
92. NAGASHIMA H., KATO Y., SHIBATA K., OGAWA S., 1987 – Development of half-embryos produced from morulae and blastocysts in pigs. *Theriogenology* 27, 262.
93. NAGASHIMA H., KATO Y., YAMAKAWA H., OGAWA S., 1988 – Survival of pig hatched blastocysts exposed below 15°C. *Japanese Journal of Animal Reproduction* 34, 123-131.
94. NAGASHIMA H., KUWAYAMA M., GRUPPEN C.G., ASHMAN R.J., NOTTLE M.B., 1996 – Vitrification of porcine early cleavage stage embryos and oocyte after removal of cytoplasmic lipid droplets. *Theriogenology* 45, pp. 180.
95. NAGASHIMA H., YAMAKAWA H., NIEMANN H., 1992 – Freezability of porcine blastocysts at different peri-hatching stages. *Theriogenology* 37, 839-850.
96. NOWAK A., KOCHAN J., PAPIS K., OKÓLSKI A., 2014 – Studies on survival of horse oocytes after rapid-i method vitrification. *Journal of Equine Veterinary Science* 34, 675-679.
97. OTOI T., YAMAMOTO K., KOYAMA, SUZUKI T., 1995 – *In vitro* fertilization and development of immature and mature bovine cryopreserved by ethylene glycol with sucrose. *Cryobiology* 32, 455-460.
98. PAPIS K., SHIMIZU M., IZAIKE Y., 2000 – Factors affecting the survivability of bovine oocytes vitrified in droplets. *Theriogenology* 54, 651-658.
99. PARK K.E., KWON I.K., HAN M.S., NIWA K. 2005 – Effects of partial removal of cytoplasmic lipid on survival of vitrified germinal vesicle stage pig oocytes. *Journal of Reproduction and Development* 51, 1, 151-160.
100. PARK S.P., KIM E.Y., OH J.H., NAM H.K., LEE K.S., PARK S.Y., PARK E.M., YOON S.H., CHUNG K.S., LIM J.H., 2000 – Ultrarapid freezing of human multipronuclear zygotes using electron microscope grids. *Human Reproduction* 15, 1787-1790.
101. PICKERING S.J., JOHNSON M.H., 1987 – The influence of cooling on the organization of the meiotic spindle of the mouse oocyte. *Human Reproduction* 2, 207-216.
102. POLGE C., 1977 – The freezing of mammalian embryos: perspectives and possibilities. In: *The Freezing of Mammalian Embryos*. Ed. Elliot K. And Whelan J., Ciba-Foundation, Elsevier, Amsterdam, pp. 3-18.
103. POLLARD J.W., LEIBO S.P., 1994 – Comparative cryobiology of in vitro and in vivo derived bovine embryos. *Theriogenology* 39, 287.
104. PRIBENSZKY C.S., DU Y., MOLNAR M., HARNOS A., VAJTA G., 2008 – Increased stress tolerance of matured pig oocytes after high hydrostatic pressure treatment. *Animal Reproduction Science* 106, 200-207.
105. PRIBENSZKY C.S., MOLNAR M., HORVARTH A., HARNOS A., SZENCI O., 2006 – Hydrostatic pressure induced increase in post-thaw motility of frozen boar spermatozoa. *Reproduction Fertility and Development* 18, 162-163.
106. PRIBENSZKY C.S., SIQUIERA E., MOLNAR M., RUMPF R., 2008 – Improved post-warming developmental competence of open pulled straw vitrified in vitro produced bovine blastocysts by sublethal hydrostatic pressure pre-treatment. *Reproduction Fertility and Development* 20, 125.
107. PTAK G., DATTENA M., LOI P., TISCHNER M., CAPPAL P., 1999 – Ovum pick-up in sheep: efficiency of in vitro embryo production, vitrification and birth of offspring. *Theriogenology* 52, 1105-1114.

108. PUGH P.A., ANKERSMIT A.E., MCGOWAN L.T., TERVIT H.R., 1998 – Cryopreservation of in vitro-produced bovine embryos: effects of protein type and concentration during freezing or of liposomes during culture on post-thaw survival. *Theriogenology* 50, 495-506.
109. PUGH P.A., TERVIT H.R., NIEMANN H., 2000 – Effects of vitrification medium composition on the survival of bovine in vitro produced embryos, following in straw dilution in vitro and in vivo following transfer. *Animal Reproduction Science* 58, 9-22.
110. PUROHIT G.N., MEENA H., SOLANKI K., 2012 – Effects of vitrification on immature and in vitro matured, denuded and cumulus compact goat oocytes and their subsequent fertilization. *Journal of Reproduction and Infertility* 13, 53-59.
111. ŘÍHA J., LANDA V., KNEISSL J., MATUS J., JINDRA M., KLOUCEK Z., 1992 – Vitri-fication of cattle embryos by direct dropping into liquid nitrogen and embryo survival after nonsurgical transfer. *Zivocisna Vyroba* 36, 113-119.
112. ROJAS C., PALOMO M.J., ALBARRACIN J.L., MOGAS T., 2004 – Vitrification of imma-ture and in vitro matured pig oocytes: study of distribution of chromosomes, microtubules, and actin microfilaments. *Cryobiology* 49, 211-220.
113. ROMEK M., GAJDA B., KRZYSZTOFOWICZ E., SMORAĞ Z., 2009 – Lipid content of non-cultured and cultured pig embryo. *Reproduction in Domestic Animals* 44, 1, 24-32.
114. RUBINSKY B., ARAV A., DE VRIES A.L., 1991 – Cryopreservation of oocytes using direc-tional cooling and antifreeze glycoproteins. *Cryoletters* 12, 93-106.
115. SARAGUSTY J., ARAV A., 2011 – Current progress in oocyte and embryo cryopreservation by slow freezing and vitrification. *Reproduction* 141, 1-19.
116. SEIDEL G.E., 1996 – Cryopreservation of equine embryos. *Veterinary Clinics of North America* 12, 85-99.
117. SEIDEL G.E., OBERSTEIN N., O'DONOVAN M.K., BRUEMMER J.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.
118. SHI W.Q., ZHU S.E., ZHANG D., WANG W.H., TANG G.L., HOU Y.P., TIAN S.J., 2006 – Improved development by taxol pre-treatment after vitrification of in vitro matured porcine oocytes. *Reproduction* 131, 795-804.
119. SILVESTRE M.A., YANIZ J., SALVADORI., SANTOLARIA P., LOPEZ-GATIUS F., 2006 – Vitrification of pre-pubertal ovine cumulus-oocyte complexes: Effect of cytochalasin B pre-treatment. *Animal Reproduction Science* 93, 176-182.
120. SMORAĞ Z., GAJDA B., 1994 – Viability of bovine embryos after different equilibration/vitrification treatment. *Annals of Applied Biology* 4/1-2, 27-31.
121. SMORAĞ Z., NIEDŹWIADEK S., GAJDA B., RYŃSKA B., BIELAŃSKI P., FIJAŁ J., GOGOL P., 1996 – Tworzenie rezerwy genetycznej wybranych linii i ras królików przy zastosowaniu metody kriokonserwacji zarodków. *Roczniki Naukowe Zootechniki*, Suplement 1, 76-79.
122. SMORAĞ Z., WIERZBOWSKI S., WIERZCHOŚ E., KARETA W., GAJDA B., 1977 – Wyni-ki transplantacji zamrożonych zarodków owiec. *Medycyna Weterynaryjna* 9, 552-554.
123. SMORAĞ Z., WIERZBOWSKI S., WIERZCHOŚ E., KAŃSKA L., GAJDA B., 1979 – Kon-serwacja zarodków bydłęcych w temperaturze ciekłego azotu. *Medycyna Weterynaryjna* 25, 299-302.
124. SOMFAI T., DINNYES A., SAGE D., MAROSAN M., CARNWATH J.W., OZAWA M., KIKUCHI K., NIEMANN H., 2006 – Development to the blastocyst stage of parthenoge-

- netically activated in vitro matured porcine oocytes after solid surface vitrification (SSV). *Theriogenology* 66, 415-422.
125. SONGSASEN N., BUCKRELL B.C., PLANTE C., LEIBO S.P., 1995 – In vitro and in vivo survival of cryopreserved sheep embryos. *Cryobiology* 32, 78-91.
  126. SQUIRES E.L., CARNEVALE E.M., MACLELLAN L.J., 2004 – Cryopreservation of equine oocytes. Proc. of a Workshop on transporting gametes and embryos. In: R&W Publications Newmarket 12, 33-37.
  127. SQUIRES E.L., CARNEVALE E.M., MCCUE P.M., BRUEMMER J.E., 2003 – Embryo technologies in the horse. *Theriogenology* 59, 151-170.
  128. SUN Q.Y., LAI L., WU G.M., PARK K.W., DAY B.N., PRATHER R.S., SCHATTEN H., 2001 – Microtubule assembly after treatment of pig oocyte with taxol: correlation with chromosomes, gamma tubulin, and MAP kinase. *Molecular Reproduction and Development* 60, 481-490.
  129. SUZUKI T., BOEDIONO A., TAKAGI M., SAHA S., SUMANTRI C., 1996 – Fertilization and development of frozen-thawed germinal vesicle bovine oocytes by a one-step dilution method *in vitro*. *Cryobiology* 33, 515-524.
  130. SZÉLL A., ZHANG J., HUDSON R., 1990 – Rapid cryopreservation of sheep embryos by direct transfer into liquid nitrogen vapour at  $-180^{\circ}\text{C}$ . *Reproduction Fertility and Development* 2, 613-618.
  131. THOMPSON J.G., ALLEN N.W., MCGOWAN L.T., BELL A.C.S., LAMBERT M.G., TERVIT H.R., 1998 – Effect of delayed supplementation of fetal calf serum to culture medium on bovine embryo development in vitro and following transfer. *Theriogenology* 49, 1239-1249.
  132. TRALDI A.S., LEBOEUF B., COGNIÉ Y., POULIN N., MERMILLOD P., 1999 – Comparative results of in vitro and in vivo survival of vitrified in vitro produced goat and sheep embryos. *Theriogenology* 51, 175.
  133. VAJTA G., 2000 – Vitrification of the oocytes and embryos of domestic animals. *Animal Reproduction Science* 60, 357-364.
  134. VAJTA G., HOLM P., GREVE T., CALLESEN H., 1997 – Vitrification of porcine embryos using the Open Pulled Straw (OPS) method. *Acta Veterinaria Scandinavica* 38, 349-352.
  135. VAJTA G., HOLM P., KUWAYAMA M., BOOTH P.J., JACOBSEN H., GREVE T., CALLESEN H., 1998 – A new way to avoid cryoinjuries of mammalian ova and embryos: the OPS vitrification. *Molecular Reproduction and Development* 51, 53-58.
  136. VAJTA G., KUWAYAMA M., 2006 – Improving cryopreservation systems. *Theriogenology* 65, 236-244.
  137. VAJTA G., NAGY P.Z., 2006 – Are programmable freezers still needed in the embryo laboratory? Review on vitrification. *Reproductive Biomedicine Online* 12, 6, 779-796.
  138. VAN DER ZWALMEN P., TOUTATI K., ECTORS F.J., MASSIP A., BECKERS J.F., ECTORS F., 1989 – Vitrification of bovine blastocysts. *Theriogenology* 31, 270.
  139. VARGA E., GARDON J.C., PAP A.B., 2006 – Effect of open pulled straw (OPS) vitrification on the fertilisation rate and developmental competence of porcine oocytes. *Acta Veterinaria Hungarica* 54, 107-116.
  140. VINCENT C., GARNIER V., HEYMAN Y., RENARD J.P., 1989 – Solvent effects on cytoskeleton organization and in vivo survival after freezing of rabbit oocytes. *Journal Reproduction and Fertility* 87, 809-820.

141. WATANABE Y., F., OLIVEIRA FILHO E.B., 1992 – Vitrification of bovine oocytes before and after maturation in vitro. Proc. 12<sup>th</sup> International Congress on Animal Reproduction, The Hague 3, 1421.
142. WHITTINGHAM D.G., LEIBO S.P., MAZUR P., 1972 – Survival of mouse embryos frozen to –196 degrees and –296 degrees C. *Science* 178, 411-414.
143. WHITTINGHAM D.G., 1976 – Low temperature storage of mammalian embryos. Gustav-Fischer Verlag (eds), Stuttgart, 45.
144. WIERZBOWSKI S., WIERZCHOŚ E., SMORAĞ Z., KARETA W., GAJDA B., KRUPIŃSKI J., ŻUKOWSKI K., 1984 – The practical application of embryo freezing and transfer for preservation of endangered polish red cattle and longwool primitive sheep. Proceeding 10<sup>th</sup> International Congress on Animal Reproduction and A.I., Urbana, USA, vol. II, 252.
145. WILMUT I., 1972 – The low temperature preservation of mammalian embryos. *Journal of Reproduction and Fertility* 46, 151.
146. WILMUT I., ROWSON L.E.A., 1973 – Experiments on the low-temperature preservation of cow embryos. *Veterinary Record* 92, 686.
147. WU M.C., LEE H.M., 1996 – Vitrification of porcine oocyte. *Journal of the Chinese Society of Animal Science* 25, 35-51.
148. ZHANG J., NEDAMBALE T.L., YANG M., LI J., 2009 – Improved development of ovine matured oocyte following solid surface vitrification (SSV): effect of cumulus cells and cytoskeleton stabilizer. *Animal Reproduction Science* 110, 46-55.

Barbara Gajda, Iwona Rajska

## Current and potential use of cryopreservation of farm animal embryos and oocytes

### Summary

The paper presents trends of development and current possibilities in cryopreservation of embryos and oocytes of cattle, pigs, sheep, goats and horses, as well as prospects for improving this technology. Two basic methods of cryopreservation, freezing and vitrification, are described. The paper discusses the main factors determining the suitability of embryos and oocytes for cryopreservation and possibilities for modifying it.

**KEY WORDS:** cryopreservation / embryo / oocyte / farm animals