



Kriokonserwacja oocytów i zarodków świni

Barbara Gajda, Zdzisław Smorąg

Zakład Fizjologii Rozrodu Zwierząt, Instytut Zootechniki,
Balice k. Krakowa

Cryopreservation of porcine oocytes and embryos

Summary

This paper presents the current possibilities, state of knowledge and prospects for cryopreservation of pig oocytes and embryos. The main factors of cryopreservation efficiency, methods for the evaluation of cryopreserved embryos, and the possibilities of modifying their susceptibility to cryopreservation are discussed. In addition, the most significant results of pig embryo freezing and vitrification and the cryotechnical aspects of this method are presented.

Key words:

pig, oocyte, embryo, hypothermic sensitivity, cryopreservation, embryo culture, embryo transfer.

1. Wprowadzenie

Biotechnologiczne metody rozrodu świń mające na celu podniesienie wydajności rozrodczej samców i samic tego gatunku są już obecnie nieodłącznym elementem liczących się w hodowli ferm trzody chlewnej. Dobry wynik ekonomiczny w hodowli świń nie jest bowiem możliwy bez osiągnięcia dobrego poziomu rozrodczości. Wydajne technologie konserwacji izolowanego materiału genetycznego w istotny sposób przyczyniłyby się do osiągnięcia tego celu.

W artykule przedstawione są aktualne możliwości, stan wiedzy oraz perspektywy kriokonserwacji oocytów i zarodków świni.

Adres do korespondencji

Barbara Gajda,
Zakład Fizjologii Rozrodu
Zwierząt,
Instytut Zootechniki,
32-083 Balice k. Krakowa;
e-mail:
bgajda@izoo.krakow.pl

2. Wrażliwość zarodków świni na schładzanie

Zarodki ssaków oceniane z punktu widzenia ich zamrażalności posiadają własną gatunkową specyfikę, co pociąga za sobą konieczność opracowywania odrębnych metod kriokonserwacji dla poszczególnych gatunków. Efekty modyfikacji nie są jednakowo zadowalające w odniesieniu do każdego gatunku ssaków. Przykładem zarodków szczególnie trudno podatnych na schładzanie i zamrażanie są zarodki świni.

Pomimo znaczących osiągnięć kriobiologii dotyczących konserwacji gamet i zarodków zwierząt gospodarskich, przez wiele lat nie udawało się skutecznie zamrozić zarodków świni. Przyczyną niepowodzeń była stwierdzona już w latach siedemdziesiątych bardzo duża wrażliwość zarodków świni na schładzanie, nawet w zakresie temperatur plusowych (1,2). W pierwszych doświadczeniach ze schładzaniem zarodków świni wykazano, że krytyczna temperatura, w której następowało zamieranie zarodków wynosi od 15 do 10°C (1,2). Jednocześnie próby schładzania zarodków do niskich temperatur plusowych z zastosowaniem związków osłaniających (DMSO, glicerol) używanych z powodzeniem do zamrażania zarodków innych gatunków nie powiodły się (3). W kolejnych badaniach wykazano, że tak duża wrażliwość zarodków świni na ochładzanie uzależniona jest, w większym stopniu niż to ma miejsce u innych gatunków, od stadium rozwoju zarodka, a także od tego czy rozwój zarodka odbywał się *in vitro* czy *in vivo* (4). Stwierdzono mianowicie, że istnieje znacząca różnica w tolerancji na niskie temperatury między wylęglą blastocystą a wcześniejszymi stadiami zarodka świni. Wylęgła blastocysta przeżywała ekspozycję w niskiej temperaturze plusowej przez 1 godzinę, natomiast wcześniejsze stadia zarodka (morula czy wczesna blastocysta) nie przeżywały w podobnych warunkach. Ponadto w badaniach przeprowadzonych przez Nagashima i wsp. (4) wykazano, co było znacznym zaskoczeniem, że blastocysty wylęgłe w hodowli *in vitro* są mniej podatne na uszkodzenia w obniżonych temperaturach plusowych niż blastocysty wylęgłe *in vivo*. Większa tolerancja na niskie temperatury blastocyst wylęgłych *in vitro* została potwierdzona testami *in vivo*, w których po transplantacji takich zarodków do biorczyń uzyskano normalne płody (4).

Podobnie jak zarodki również oocyty świni są bardzo wrażliwe na schładzanie i nie tolerują oziębienia do temperatury 15°C lub niższej (5,6).

Stwierdzona duża wrażliwość zarodków świni jak też plemników knura na schładzanie, nie obserwowana u zarodków innych gatunków zwierząt laboratoryjnych czy domowych, wskazuje na specyficzną dla tego gatunku nietolerancję niskich temperatur. W odniesieniu do nasienia knura przetrzymywanego w temperaturze 15°C korzystny okazał się dodatek fosfolipidów (7). W przypadku zarodków świni próby dodawania fosfolipidów nie przyniosły pozytywnych rezultatów.

Specyficzna nietolerancja na niskie temperatury plusowe, zarówno plemników, oocytów, jak i zarodków świni manifestuje się również ich wrażliwością na kriokonserwację.

3. Czynniki warunkujące podatność na kriokonserwację zarodków świni

3.1. Stadium zarodka

Zarodki świni, podobnie jak zarodki niektórych gatunków ssaków, charakteryzują się zróżnicowaną podatnością na kriokonserwację w zależności od stadium rozwoju. Wczesne stadia rozwojowe, od zygoty aż do moruli i wczesnej blastocysty nie przeżywają kriokonserwacji. Podczas gdy stadia bardziej zaawansowane, a mianowicie blastocysty ekspandujące, wylęgające i wylęgle przeżywają zarówno mrożenie jak i witrifikację. Dlatego też wszystkie dotychczasowe sukcesy jakie zanotowano w kriokonserwacji zarodków świni osiągnięte zostały przy użyciu zarodków znajdujących się w stadium bliskim wylęgania.

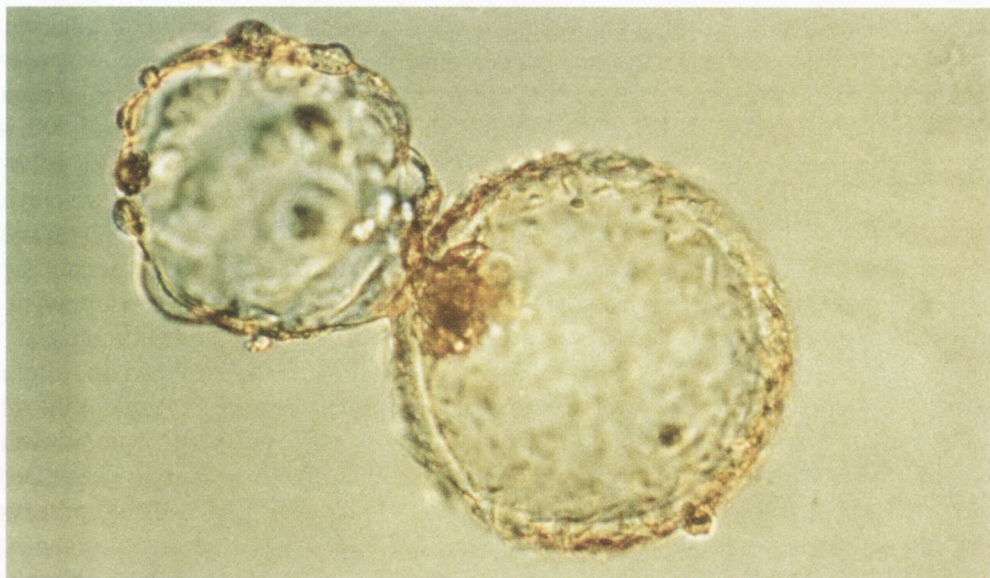
Również z badań własnych (8) dotyczących witrifikacji morul i blastocyst świńskich wynikało, że przeżywalność zarodków uwarunkowana była stadium rozwoju zarodka poddawanego witrifikacji. Zarodki w stadium blastocysty przeżywały na poziomie ok. 30%, natomiast nie przeżył żaden z zarodków witrifikowanych w stadium moruli.

3.2. Stan fizjologiczny

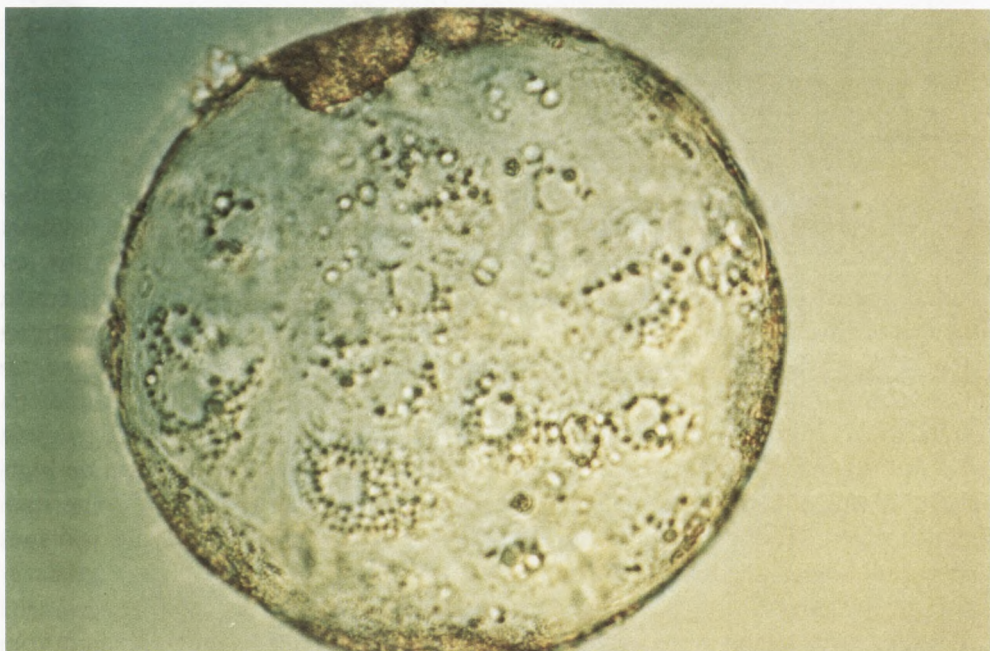
Podatność na kriokonserwację zarodków świni uzależniona jest nie tylko od stadium rozwoju zarodka, lecz także od tego czy rozwój zarodka następował *in vitro* czy *in vivo*. W doświadczeniach własnych nad witrifikacją zarodków wyprodukowanych *in vitro* (9) wykazaliśmy, że podatność na witrifikację takich zarodków jest wyższa niż zarodków uzyskanych *in vivo* (fot. 1 i 2). Przeciwnie do wyników naszych doświadczeń, w badaniach Dobrinsky'ego (10) nie wykazano wpływu hodowli zarodków świńskich na ich przeżywalność po kriokonserwacji. Jednakże Nagashima i wsp. (11), podobnie jak my, obserwowali korzystny wpływ krótkiej hodowli na przeżywalność kriokonserwowanych zarodków świni. Wydaje się, że podwyższona podatność na witrifikację zarodków hodowanych jest specyficzna dla zarodków świni i może być wynikiem modyfikacji zawartości lub składu związków lipidowych w zarodku hodowanym do stadium blastocysty.

3.3. Rodzaj związków osłaniających

Ważnym czynnikiem decydującym o efektywności kriokonserwacji jest rodzaj użytego związku osłaniającego. W doświadczeniach nad zamrażaniem zarodków świni stosowano najczęściej glicerol (11-13) lub glicerol z dodatkiem żółtka jaja kurzego (14) lecytyny (15) czy też trehalozy (16). Przeżywalność zamrożonych zarod-



Fot. 1. Witryfikowana blastocysta świńska po 24 godz. hodowli *in vitro*.



Fot. 2. Witryfikowana blastocysta świńska po 48 godz. hodowli *in vitro*.

ków oceniana była najczęściej na podstawie rozwoju *in vitro* i wynosiła od kilku do ponad 30%. W przypadku zastosowania glicerolu z żółtkiem jaja do zarodków w różnym stadium rozwoju, po transplatacji wylęglých blastocyst do sześciu biorczyń uzyskano jedno prosię (12,13,15).

Do witrifikacji zarodków świni używano mieszanin opartych na glicerolu, glikolu etylenowym, glikolu propylenowym lub DMSO. Niektóre z mieszanin witrifikacyjnych okazały się bardzo toksyczne dla zarodków świni. Dobrinsky i Johnson (17) badając toksyczność mieszanin wykazali, że ekspandujące blastocysty rozwijały się najlepiej po ekspozycji w mieszaninach opartych na glicerolu i glikolu etylenowym, podczas gdy wylęglę blastocysty rozwijały się tylko w VS3 opartym na glicerolu.

W badaniach własnych (8) stosowaliśmy mieszaninę glikolu etylenowego, fikolu i sacharozy (EFS) oraz glikolu etylenowego, fikolu i trehalozy (EFT). Przeżywalność morul przetrzymywanych w mieszaninie EFT była wyższa niż przetrzymywanych w niej blastocyst. Obserwacje te potwierdzają badania przeprowadzone przez Dobrinsky'ego i Johnsona (17), którzy wykazali, że 5-dniowe zarodki świńskie przeżywały w wyższym stopniu niż zarodki 6- i 7-dniowe. Autorzy ci stwierdzili ponadto, że jedna z badanych przez nich mieszanin osłaniających (VS3a) okazała się nietoksyczna niezależnie od wieku traktowanych zarodków. Podobnie w przeprowadzonym przez nas doświadczeniu (8) uzyskaliśmy 30-40% przeżywalność morul i blastocyst przetrzymywanych w mieszaninie EFS. Natomiast w kolejnym doświadczeniu (18) mieszanina EFS okazała się bardziej toksyczna dla wylęglých niż dla ekspandujących blastocyst, co z kolei znalazło odzwierciedlenie w rezultatach witrifikacji.

3.4. Obecność związków lipidowych

Mała tolerancja zarodków świni na schładzanie i kriokonserwację jest prawdopodobnie spowodowana wysoką zawartością lipidów obserwowanych w cytoplazmie wczesnych zarodków tego gatunku (3,19). Stwierdzono, że podczas schładzania dochodzi do naruszenia integralności wewnątrzkomórkowych lipidów, co jest powodem zniszczenia cytoplazmy i w rezultacie prowadzi do nieodwracalnych zmian degeneracyjnych zarodka (20). Ponadto w zarodkach przetrzymywanych w temperaturze 15°C stwierdzano strukturalne zmiany lipidów (21). Doświadczenia nad zamrażaniem zarodków 2- i 8-blastomerowych, z których wcześniej usunięto lipidy na drodze mikrochirurgicznej, doprowadziły po rozmrożeniu do uzyskania rozwoju *in vitro* do stadium blastocysty oraz normalnego potomstwa po transplatacji do biorczyń (22). Dowodzi to, że zarodki świni pomimo braku lipidów są zdolne do normalnego rozwoju. Trudne natomiast do wyjaśnienia pozostają pytania, czy i w jaki sposób zarodki świni kompensują brak lipidów w cytoplazmie i czy w trakcie ich dalszego rozwoju mogą syntetyzować dodatkowe lipidy?

Wraz z osiągnięciem przez zarodek świni bardziej zaawansowanego stadium rozwoju koncentracja lipidów maleje (23). Wykazano, że im mniejsza zawartość lipi-

dów w zarodkach, tym większa jest ich tolerancja na schładzanie i zamrażanie. Potwierdzono to na podstawie obserwacji, że zarodki świni, w bardziej zaawansowanych stadiach rozwoju (ekspandującej i wylęglej blastocysty), mogą przeżywać w 60-80% zamrażanie do -20°C .

4. Ocena efektywności kriokonserwowanych zarodków

4.1. Hodowla *in vitro*

Hodowla *in vitro* jest podstawową metodą stosowaną do oceny przeżywalności zarodków po mrożeniu lub witrifikacji. Zapewnienie zatem optymalnych warunków hodowli *in vitro*, które umożliwiłyby kriokonserwowanym zarodkom kolejne podziały prowadzące do powstania przedimplantacyjnego stadium zarodka, tj. wylęglej blastocysty jest istotnym czynnikiem wpływającym na efektywność oceny. Warunki takie zapewniają różne systemy hodowli *in vitro*. Ich efektywność jednak jest zróżnicowana i w wielu przypadkach niezadowalająca.

Pierwsze udane próby hodowli *in vitro* zarodków świni przeprowadzono przy użyciu prostej pożywki opartej na płynie Krebsa-Ringera (24). Pozwalały one na prowadzenie efektywnej hodowli zarodków od stadium 4-komórkowego. Zastosowany dodatek białka w postaci albuminy surowicy bydlęcej (BSA) zwiększał możliwości rozwoju zarodków wczesnych stadiów (25).

W kolejnych badaniach zarodki świni hodowano w pożywkach zawierających oprócz soli i białka związku energetyczne takie jak glukoza (26-28), mleczan wapnia (29), pirogronian (28,30) czy aminokwasy (30).

Stosowano również współhodowle zarodków świni z komórkami nabłonka jajowodu, komórkami ziarnistymi pęcherzyka jajnikowego czy fibroblastami płodowymi (31,32).

Wykazano, że pożywka uzupełniona płynem jajowodowym (33) może poprawiać zdolności rozwojowe wczesnych zarodków świni, natomiast dodatek surowicy owczej, bydlęcej czy ludzkiej (34,35) może wpływać korzystnie na liczbę zarodków osiagających stadium blastocysty.

Zastosowanie współhodowli lub pożywek wymagających uzupełnienia w postaci albuminy czy surowicy nie zawsze jest korzystne. Znacznie lepszym rozwiązaniem jest użycie pożywek o ściśle określonym składzie chemicznym. Jedną z najpopularniejszych jest zastosowana po raz pierwszy do hodowli zarodków świni przez North Carolina State University pożywka zwana NCSU-23 (36).

W badaniach własnych (37) nad wyborem optymalnej pożywki do hodowli zarodków świni porównywano rozwój *in vitro* wczesnych zarodków świni w pięciu wybranych pożywkach o zdefiniowanym składzie chemicznym: NCSU-23, NCSU-37, TLH, CZB i mW. W przeprowadzonych doświadczeniach wykazano, że pożywka NCSU-23

zapewnia optymalne warunki do kilkudniowej hodowli *in vitro* wczesnych zarodków świni. W pożywce tej zarówno odsetek zarodków dzielących się (90%) jak i odsetek uzyskanych morul (90%) blastocyst (84,3%) i wylętych blastocyst (70,6%) był najwyższy i porównywalny z wynikami osiąganymi podczas hodowli *in vitro* zarodków innych gatunków ssaków. Podobne wyniki rozwoju zarodków świni w pożywce NCSU-23 uzyskiwali inni autorzy (28,36,38-40).

Zarodki hodowane w pożywce NCSU-23 przez 4 dni transplantowano do biorczyń uzyskując podobną liczbę ciąży jak po transplatacji zarodków nie hodowanych (cyt. za 41). Świadczy to o pełnych zdolnościach rozwojowych zarodków hodowanych w tej pożywce.

Zarodki świni po rozmrożeniu i usunięciu związków osłaniających hoduje się *in vitro* w ok. 1,0 ml pożywki, w temperaturze 39°C. Hodowlę zarodków przeprowadza się w atmosferze 5% CO₂ w powietrzu lub w mieszance gazowej o składzie 5% CO₂, 5% O₂ i 90% N₂. Czas hodowli uzależniony jest od stadium rozwoju rozmrożonego zarodka. Kryterium przeżywalności zarodka stanowi jego dalszy rozwój w warunkach *in vitro*.

4.2. Transplantacja do biorczyń

Ocena pełnego rozwoju kriokonserwowanych zarodków przeprowadzana jest na podstawie rozwoju *in vivo*, po transplatacji do dróg rodnych zsynchronizowanych biorczyń.

4.2.1. Chirurgiczna

Najczęściej stosowaną w praktyce metodą transplantacji zarodków u świń jest metoda chirurgiczna. Metoda ta stosowana jest ze względu na specyficzną budowę anatomiczną narządów rodnych lochy. Metoda chirurgiczna polega na laparotomii klasycznej czyli otwarciu jamy brzusznej w linii białej, co umożliwia łatwy dostęp do jajników i rogów macicy. Zarodki bezpośrednio po rozmrożeniu, usunięciu związków osłaniających i ocenie morfologicznej przenosi się do dróg rodnych biorczyń. W zależności od stadium rozwoju rozmrożonych zarodków wprowadza się je do jajowodów lub rogów macicy za pomocą pipetki lub specjalnej strzykawki. Liczba wprowadzanych zarodków wynosi najczęściej od ok. 20 do 40. Wykonanie zabiegu w ten sposób powoduje minimalne krwawienie, lecz wydłuża czas zrostu rany pooperacyjnej. Ponadto laparotomia, jak każda operacja chirurgiczna, wywołuje miejscowy i ogólny odczyn, który zależy od rozległości rany i właściwości danego organizmu przebiega z większym lub mniejszym nasileniem. Niebagatelną rolę odgrywa również stres związany ze znaczną ingerencją chirurgiczną i ewentualnymi powikłaniami. Alternatywą dla tych zabiegów są metody niechirurgiczne.

4.2.2. Niechirurgiczna

Metoda niechirurgiczna nie znalazła jeszcze praktycznego zastosowania u świń, jednakże w literaturze opisanych jest kilka modyfikacji kateteru do przenoszenia zarodków opartych głównie na sprężeniu stosowanym u bydła (42-45). Kateter taki wprowadza się przez szyjkę do rogu macicy. Efektywność przenoszenia zarodków u świń metodą niechirurgiczną jest dużo niższa w porównaniu do metody chirurgicznej (46) i wymaga dalszego doskonalenia stosowanego sprzętu oraz poprawy efektywności. Poważnym ograniczeniem metody jest możliwość przenoszenia zarodków tylko w stadium bardziej zaawansowanym tzn. takim, które jest deponowane w macicy.

5. Modyfikacje podatności oocytów i zarodków świni na kriokonserwację

5.1. Mikrochirurgiczne usuwanie związków lipidowych

W zarodkach świni stężenie związków lipidowych jest stosunkowo wysokie i maleje wraz z rozwojem zarodka. Wysoka zawartość lipidów jest, jak już wspomniano, przyczyną wyjątkowo dużej wrażliwości zarodków świni, zwłaszcza wczesnych stadiów, na kriokonserwację. Doświadczenia nad mrożeniem zarodków 2-8 komórkowych, z których usunięto lipidy na drodze mikrochirurgicznej (22) doprowadziły po rozmrożeniu do uzyskania rozwoju *in vitro* do stadium blastocysty oraz normalnego potomstwa po transplantacji do biorczyń. Stwierdzono także, że ponad połowa zarodków, którym usunięto lipidy przeżyła kriokonserwację, bez względu na to czy były one mrożone natychmiast po zabiegu usunięcia czy też po wcześniejszej hodowli. Natomiast żaden z zarodków kontrolnych nie przeżył procesu mrożenia. W badaniach tych po raz pierwszy wykazano, że zarodki świni we wczesnych stadiach po usunięciu z nich związków lipidowych mogą być z powodzeniem poddawane kriokonserwacji.

W kolejnych doświadczeniach (47) stwierdzono, że również zarodki starsze w stadium moruli/wczesnej blastocysty, po wcześniejszym usunięciu związków tłuszczowych, przeżywały kriokonserwację znacznie efektywniej w porównaniu do zarodków, którym nie usunięto lipidów. Potwierdzona została również możliwość pełnego rozwoju *in vivo*, zarówno mrożonych jak i witryfikowanych zarodków z usuniętymi lipidami.

Metoda usuwania związków lipidowych z zarodków na drodze mikrochirurgicznej, mimo że znacznie poprawia efektywność kriokonserwacji to nie nadaje się jednak do praktycznego stosowania.

5.2. Dodatek substancji stabilizujących cytoszkielet

Inną możliwością podwyższenia efektywności kriokonserwacji zarodków świni jest dodatek substancji stabilizujących strukturę szkieletu cytoplazmatycznego. Wiadomo, że proces kriokonserwacji może powodować naruszenie tej struktury zarodka. Znane są związki takie jak cytochalazyna-B czy kolchicyna, które mogą pełnić rolę stabilizatorów struktury szkieletu (48). Dobrinsky i wsp. (49,50) badali wpływ cytochalazyny-B na depolaryzację mikrofilamentów i efektywność witryfikacji zarodków świńskich. Stwierdzono korzystny wpływ tej substancji na przeżywalność *in vitro* witryfikowanych, ekspandujących i wylęglých blastocyst. Natomiast w przypadku morul/wczesnych blastocyst nie stwierdzono poprawy efektywności witryfikacji. Ponadto w przeprowadzonej analizie komórkowej w mikroskopie konfokalnym wykazano znaczne uszkodzenia cytoszkieletu w witryfikowanych zarodkach nie traktowanych cyto-B, podczas gdy witryfikowane zarodki traktowane substancją stabilizującą wykazywały w większości normalną repolaryzację mikrofilamentów i innych składników cytoszkieletu. Na podstawie tych obserwacji dowiedziono, że kriokonserwacja może oddziaływać na cytoszkielet, oraz iż depolaryzacja mikrofilamentów przed witryfikacją znacznie zwiększa przeżywalność zarodków po witryfikacji (47).

6. Kriotechniczne aspekty oraz efektywność kriokonserwacji zarodków świni

W tabeli przedstawiono najbardziej znaczące wyniki kriokonserwacji oocytów i zarodków świni.

Tabela

Wyniki kriokonserwacji oocytów i zarodków świni

Stadium zarodka	Związki ostaniające	Metoda kriokonserwacji	Przeżywalność zarodków	Literatura
1	2	3	4	5
EXB	1,5 M GLY	wolne mrożenie (-35°C)	<i>in vivo</i> : prosięta (5/11)	Hayashi i wsp., 1989 (12)
EXB	1,5 M GLY + lecytyna	wolne mrożenie (-35°C)	<i>in vivo</i> : prosięta (2/20)	Kameyama i wsp., 1990 (15)
<i>in vitro</i> WB	1,5 M GLY	wolne mrożenie (-35°C)	<i>in vivo</i> : prosięta (4/32)	Kashiwazaki i wsp., 1991 (13)
B, EXB, WB, <i>in vitro</i> WB	1,5 M GLY	wolne mrożenie (-196°C)	<i>in vitro</i> : B – 6%, EXB – 51%, WB – 69%, pWB – 0%, <i>in vitro</i> WB – 82%	Nagashima i wsp., 1992 (11)
WB	1,4 M GLY + 10% żółtka jaja	wolne mrożenie (-196°C)	<i>in vivo</i> : 1 prosię (1/6)	Fujino i wsp., 1993 (14)

1	2	3	4	5
EXB, WB	EFT, DAP213, DAP213-T, EPT	witryfikacja	<i>in vitro</i> : EXB: 4, 8, 17, 29% WB: 7, 8, 21, 0%	Yoshino i wsp., 1993 (52)
M-B, EXB, WB	VS3a	witryfikacja	<i>in vitro</i> : M-B: 0% EXB – 27% WB – 39%	Dobrinsky i Johnson, 1994 (6)
B, EXB, WB	E + PVP	witryfikacja	<i>in vitro</i> : B – 26%, EXB – 33%, WB – 11%	Kobayashi i wsp., 1995ab (53,54)
WB	1,5 M GLY	wolne mrożenie	<i>in vitro</i> : 68% <i>in vivo</i> : 2 prosięta	Modl i wsp., 1996 (55)
oocyty	DMSO, DAP213, EF, EFT	szybkie mrożenie witryfikacja	<i>in vitro</i> : mroz. – 58% witryf.: 32 – 97%	Wu i Lee, 1997 (56)
M, B, EXB, WB	30% E + 1 M S + 5% żółtko jaja	witryfikacja	<i>in vitro</i> : M – 33%, B – 100%, EXB – 20%, WB – 44%	Kuwayama i wsp., 1997 (57)
4-kom., 8-16 kom., M, B	E + DMSO + S	witryfikacja–OPS	<i>in vitro</i> : 4-kom. – 33% 8-16 kom. – 0% M – 70% B – 73%	Vajta i wsp., 1997 (58)
M, B cult. and non-cult.	EFS, EFT	witryfikacja	<i>in vitro</i> : M – 0% B-cult. ok. 30% B-non-cult. 12%	Gajda i Smorąg, 2000 (8)
M, B	E + DMSO + S w TCM199 lub PBS	witryfikacja–OPS	<i>in vitro</i> : B-27 i 67% (PBS) ok. 42% (TCM199) M – 11% i 14%, <i>in vivo</i> : B-5% (PBS)	Berthelot i wsp., 2000 (59)
M – WB	6,5 M glicerol + 6% BSA + cyto-B	witryfikacja	<i>in vitro</i> : WB – 65% <i>in vivo</i> : WB – k. 60%	Dobrinsky i wsp., 2000 (60)
M compact	E + DMSO + S	witryfikacja–OPS	<i>in vivo</i> : 13%	Berthelot i wsp., 2001 (61)

Objaśnienia:

Stadium zarodka: M – morula, B – blastocysta, EXB – ekspandująca blastocysta, WB – wylęgła blastocysta, pWB – wylęgła blastocysta późna. Związki osłaniające: GLY – glicerol, E – glikol etylenowy, F – fikol, P – glikol propylenowy, DMSO – dwumetylosulfotlenek, DAP213 – DMSO + acetamid + P, VS3a – GLY + BSA, PVP – poliwinylpirolidyna, S – sacharoza, T – trechaloza. Płyny i uzupełnienia do manipulacji i hodowli zarodków: PBS, TCM199, BSA – albumina surowicy bydłowej, cyto-B – cytochalazyna-B.

Pierwsze sukcesy jakie zanotowano w kriokonserwacji zarodków świnii były przede wszystkim rezultatem użycia do zamrażania zarodków w odpowiednim stadium rozwoju, tj. ekspandującej lub wylęgłej blastocysty (51). W procedurze zamrażania zakładano kontrolowane wolne schładzanie z szybkością 0,3°C/min i użycie glicerolu jako związku osłaniającego. Efektywność tych pierwszych prób była dość niska, gdyż jedenaście prosiąt, urodzonych w wyniku przeprowadzonych badań, uzyskano po transplantacji 63. kriokonserwowanych zarodków.

W kilku następnych pracach nad zamrażaniem zarodków świni liczba użytych do doświadczeń zarodków była stosunkowo mała, a przeżywalność zamrożonych ekspandujących i wylęgłych blastocyst oceniana najczęściej *in vivo* była niska. Natomiast nie przeżywały procedury zamrażania zarodki młodsze od wczesnej blastocysty oraz wylęgłe blastocysty o średnicy większej niż 300 μm (11). Ponadto, przedstawiane protokoły zamrażania często nie dawały powtarzalnych wyników. Niemniej jednak stwierdzono, że dla efektywnego zamrożenia zarodków świni koniecznym jest spełnienie kilku podstawowych warunków. Zamrażane winny być blastocysty w stadium *peri-hatching*, świeże lub po wcześniejszej hodowli w standardowych mediach, koniecznie z dodatkiem albuminy bydlęcej. Jako krioprotektor powinien być użyty 1,5 M glicerol, chociaż nie wyklucza się użycia innych związków osłaniających. W procedurze wolnego zamrażania zakłada się schładzanie zarodków od temperatury pokojowej do temperatury posiewania z szybkością wynoszącą 1°C/minutę. Po zainicjowaniu krystalizacji zarodki zamraża się wolno ok. 0,3°C/minutę do temperatury od -35 do -38°C i przekłada do ciekłego azotu. Rozmrażanie zarodków przeprowadza się w łaźni wodnej o temperaturze 35-37°C przy użyciu 0,3-0,5 M sacharozy. Zastosowanie sacharozy zmniejsza ryzyko wystąpienia uszkodzeń spowodowanych szkodliwym oddziaływaniem związku osłaniającego, w tym również uszkodzeń natury osmotycznej.

W ostatnich latach badania z zakresu kriokonserwacji zarodków świni skoncentrowane są głównie na ich witrifikacji. W metodzie tej zestalanie płynów odbywa się nie na drodze krystalizacji, ale poprzez bardzo szybki wzrost lepkości w trakcie schładzania. Głównym problemem witrifikacji jest toksyczność związków osłaniających oraz uszkodzenia natury osmotycznej. Koncentracja związków osłaniających niezbędna do uzyskania witrifikacji jest stosunkowo wysoka i dlatego nie jest tolerowana przez większość materiałów biologicznych. W odniesieniu do zarodków świni metoda witrifikacji pozostaje nadal na etapie badań.

Znaczący postęp w metodzie witrifikacji został osiągnięty dzięki minimalizacji objętości płynu zawierającego witrifikowany zarodek (tzw. „metoda OPS”) (62). 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: od 14 do 70%, blastocysta: od 67 do 73% (58,59) oraz *in vivo* (morula: 13%, blastocysta: 55%) (59,61). W przeprowadzonych wstępnych badaniach własnych potwierdzono pozytywny wpływ zminimalizowanej objętości witrifikowanej próbki na przeżywalność zarodków świni w stadium moruli i blastocysty (63).

Stosowane ostatnio modyfikacje metody witrifikacji, wykorzystujące wysokie tempo schładzania, to m.in. metoda kropłowa zastosowana do oocytów (64) i zarodków bydlęcych (65), pętelkowa (*cryoloop container-less*) używana z powodzeniem do zarodków chomika (66) i człowieka (67), czy też metoda z zastosowaniem siateczki mikroskopowej (EM *grids*) (68) lub schłodzonego poniżej -200°C ciekłego azotu. (69). Metody te, chociaż, jak się wydaje, są dość atrakcyjne, to jednak były wykorzy-

stywane w bardzo ograniczonym zakresie. Nie stosowano ich, jak dotychczas, do zarodków świni.

Zainteresowanie opracowaniem efektywnych metod kriokonserwacji zarodków świni powodowane jest zarówno względami praktycznymi jak i teoretycznymi. Wprowadzenie bowiem nowych technologii w rozrodzie świń takich jak pozaustrojowe zapłodnienie i produkcja zarodków czy też niechirurgiczna transplantacja będzie się wiązało z większym zapotrzebowaniem na kriokonserwowane oocyty czy zarodki. Z kolei opracowanie efektywnych metod kriokonserwacji wiąże się m.in. z prowadzeniem intensywnych badań związanych ze zmianami w komórkach na poziomie molekularnym w czasie i po zakończeniu procesu kriokonserwacji.

Literatura

1. Wilmut I., (1972), *J. Reprod. Fertil.*, 31, 513.
2. Polge C., Wilmut I., Rowson L. E. A., (1974), *Cryobiology*, 11, 560.
3. Niemann H., (1985), in: *Workshop on Embryos and Oocytes Freezing*, Annecy, France, 153.
4. Nagashima H., Kato Y., Yamakawa H., Ogawa S., (1988), *Theriogenology*, 37, 321.
5. Didion B. A., Pomp D., Martin M. J., Homanics G. E., Market C. L., (1990), *J. Anim. Sci.*, 68, 2803.
6. Dobrinsky J. R., Johnson L. A., (1994), *Theriogenology*, 37, 111.
7. Butler W. J., Roberts T. K., (1975), *Biol. Reprod.*, 37, 441-451.
8. Gajda B., Smoraż Z., (2000), *Cryo-Lett.*, 21, 231-236.
9. Gajda B., (1999), *Ann. Anim. Sci.*, 26, 4, 149-154.
10. Dobrinsky J. R., (1993), *Embryo Transfer Newsletter*, 11, 13.
11. Nagashima H., Yamakawa H., Niemann H., (1992), *Theriogenology*, 37, 839-850.
12. Hayashi S., Kobayashi K., Mizuno J., Saitoh K., Hirano S., (1989), *Vet. Rec.*, 128, 256.
13. Kashiwazaki N., Ohtani S., Miyamoto K., Ogawa S., (1991), *Vet. Rec.*, 128, 256-257.
14. Fujino Y., Ujisato Y., Endo K., Tomizuka T., Kojima T., Oguri N., (1993), *Cryobiology*, 30, 299-305.
15. Kameyama K., Takedomi T., Itakura H., Onihara T., (1990), *The 78th Ann. Conf. Soc. Anim. Reprod.*, 22.
16. Cameron R. D. A., Lising R., Nagashima H., Blackshaw A. W., (1992), *Proc. The 12th Intern. Pig Vet. Soc.*, The Hague, The Netherlands, p. 476.
17. Dobrinsky J. R., Johnson L. A., (1994), *Theriogenology*, 42, 25-35.
18. Gajda B., Smoraż Z., (2002), *CryoLetters*, 23, 385-388.
19. Toner M., Cravalho E. G., Ebert K. M., Overstrom E. W., (1986), *Biol. Reprod.*, 34 (suppl.), 98.
20. Mohr I. R., Trounson A. O., (1981), *Biol. Reprod.*, 25, 1009-1025.
21. Edidin M., Petit V. A., (1977), in: *Ciba Foundation Symposium*, 155-174, Ed. Excerpta Medica, New York.
22. Nagashima H., Kashiwazaki N., Ashman R. J., Grupen C. G., Nottle M. B., (1995), *Nature*, 374, 416.
23. Niimura S., Ishida K., (1980), *Jap. J. Anim. Reprod.*, 26, 46-49.
24. Davis D. L., Day B. N., (1978), *J. Anim. Sci.*, 46, 1043-1053.
25. Wright R. W. Jr., (1977), *J. Anim. Sci.*, 44, 854.
26. Youngs C. R., McGinnis L. K., (1990), *Biol. Reprod.*, 42 (suppl.), 58 (abstr.).
27. Misener M., Pollard J. W., Metzger K., (1991), *Theriogenology*, 35, 244 (abstr.).
28. Petters R. M., Reed M., (1991), *Theriogenology*, 35, 244.
29. Stone B. A., Quinn P., Seamark R. F., (1984), *Anim. Reprod. Sci.*, 7, 405-412.
30. Petters R. M., Johnson B. H., Reed M. L., Archibong A. E., (1990), *J. Reprod. Fertil.*, 89, 269-275.
31. White K. L., Hehnke K., Rickords L. F., Southern L. L., Thompson D. L. Jr., Wood T. C., (1989), *Biol. Reprod.*, 41, 425-430.
32. Smith S., Schmidt M., Purwantara B., Greve T., (1992), *Acta Vet. Scan.*, 33, 349-355.

33. Archibong A. E., Petters R. M., Johnson B. H., (1989), *Biol. Reprod.*, 41, 1076-1083.
34. Robl J. M., Davis D. L., (1981), *J. Anim. Sci.*, 52, 1450-1456.
35. Rosenkrans R., Davis D. L., Milliken G., (1989), *J. Anim. Sci.*, 67, 1503-1508.
36. Reed M. L., Illera M. J., Peters R. M., (1992), *Theriogenology*, 37, 95-109.
37. Gajda B., (1998), *Ann. Anim. Sci.*, 25, 1, 31-38.
38. Illera M. J., Lorenzo P., Illera J. C., Silvan G., Portela A., Petters R. M., (1992), *Theriogenology*, 37, 225.
39. Torres C. R. L., Rath D., (1992), *Theriogenology*, 37, 283.
40. Rath D., Niemann H., Torres C. R. L., (1995), *Theriogenology*, 43, 913-926.
41. Prather R., Day B. N., (1998), *Theriogenology*, 49, 23-32.
42. Hazeleger W., Kemp B., (1994), *Reprod. Dom. Anim.*, 29, 481-487.
43. Li J., Rieke A., Day B. N., Prather R. S., (1996), *J. Anim. Sci.*, 74, 2263-2268.
44. Besenfelder U., Mödl J., Müller M., Brem G., (1997), *Theriogenology*, 47, 1051-1060.
45. Hazeleger W., Kemp B., (1999), *Theriogenology*, 51, 81-90.
46. Youngs C. R., (2001), *Theriogenology*, 56, 1311-1320.
47. Dobrinsky J. R., (1999), *Embryo Transfer Newsletter*, 11, 18-23.
48. Dobrinsky J. R., (1996), *Theriogenology*, 45, 17.
49. Dobrinsky J. R., Long C. R., Johnson L. A., (1997), 47, 343.
50. Dobrinsky J. R., Pursel V. G., Long C. R., Johnson L. A., (1998), *Theriogenology*, 49, 166.
51. Gajda B., Smorąg Z., (1998), *Biotechnologia*, 2 (41), 10-32.
52. Yoshino J., Kojima T., Shimizu M., Tomizuka T., (1993), *Cryobiology*, 30, 413-422.
53. Kobayashi S., Tomita M., Pollard J. W., Leibo S. P., (1995a), *Theriogenology*, 41, 228.
54. Kobayashi S., Takei M., Ichikawa A. T., Leibo S. P., (1995b), *Cryobiology*, 32, 589-590.
55. Mödl J., Reichenbach H. D., Wolf E., Brem G., (1996), *Vet. Rec.*, 139, 208-210.
56. Wu M. C., Lee H. M., (1996), *J. Chin. Soc. Anim. Sci.*, 25, 1, 35-51.
57. Kuwayama M., Holm P., Jacobsen H., Greve T., Callesen H., (1997), *Vet. Rec.*, 4, 365.
58. Vajta G., Holm P., Greve T., Callesen H., (1997), *Acta Vet. Scand.*, 38, 349-352.
59. Berthelot F., Martinat-Botte F., Locatelli A., Perreau C., Terqui M., (2000), *Cryobiology*, 41, 2, 116-1124.
60. Dobrinsky J. R., Pursel V. G., Long C. R., Johnson L. A., (2000), *Biol. Reprod.*, 62, 3, 564-570.
61. Berthelot F., Martinat-Botte F., Perreau C., Terqui M., (2001), *Reprod. Nutr. Dev.*, 41, 3, 267-272.
62. Vajta G., Booth P. J., Holm P., Greve T., Callesen H., (1997), *Cryo-Letters*, 18, 191-195.
63. Gajda B., Smorąg Z., (2001), *Mat. II Zjazdu TBR, Warszawa, 5-8 czerwiec, P-IV-4*.
64. Papis K., Shimizu M., Izaike Y., (2000), *Theriogenology*, 54, 651-658.
65. Riha J., Landa V., Kneissl J., Matus J., Jindra M., Kloucek Z., (1991), *Zivoc. Vyr.*, 36, 113-119.
66. Lane M., Forest K., T., Lyons E. A., Bavister B. D., (1999), *Theriogenology*, 51, 167.
67. Lane M., Schoolcraft W. B., Gardner D. K., (1999), *Fertil. Steril.*, 72, 1073-1078.
68. Park S. P., Kim E. Y., Kim D. I., Park N. H., Won Y. S., Yoon S. H., Chung K. S., Lim J. H., (1999), *Hum. Reprod.*, 14, 2838-2843.
69. Arav A., Zeron Y., Ocheretny A., (2000), *Theriogenology*, 53, 248.