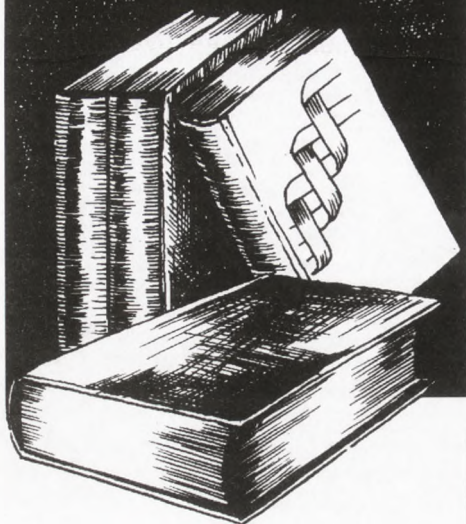


Prace  
przeglądowe



## Kriokonserwacja oocytów i zarodków ssaków

*Barbara Gajda*

*Zdzisław Smorąg*

Zakład Fizjologii Rozrodu Zwierząt

Instytut Zootechniki

Balice k. Krakowa

### Wprowadzenie

Mimo że od czasu uzyskania potomstwa myszy po transplantacji zamrożonych zarodków upłynęło 25 lat, wciąż wiele problemów kriokonserwacji oocytów i zarodków ssaków pozostaje nie rozwiązanych. Nadal niezadowalająca jest zamrażalność zarodków niektórych gatunków ssaków, a w obrębie tego samego gatunku często bardzo zróżnicowana jest podatność na zamrażanie poszczególnych stadiów rozwojowych zarodka. Oddzielnym problemem jest kriokonserwacja oocytów ssaków. Mimo zanotowanego w ostatnich latach postępu skuteczność opracowanych dotąd metod jest na ogół dość niska.

W ostatnim dziesięcioleciu rozwijana jest intensywnie witrifikacja jako nowa metoda kriokonserwacji oocytów i zarodków. Stwarza ona nowe możliwości kriokonserwacji, ale jednocześ-

nie posiada ograniczenia, które nie występowały w przypadku stosowania konwencjonalnych metod zamrażania. Przegląd prac z zakresu witrifikacji do roku 1994 został przedstawiony w nr 3/30 '95 „Biotechnologii” (1).

Celem pracy jest syntetyczne przedstawienie obecnych możliwości kriokonserwacji zarodków i oocytów poszczególnych gatunków ssaków, zarówno metodą zamrażania jak i witrifikacji. Szczególną uwagę poświęcimy najważniejszym czynnikom decydującym o efektywności tych metod, tj. stadium rozwoju zarodka, rodzaju i koncentracji związku osłaniającego, sposobu dodawania i usuwania krioprotektorów oraz stanowi fizjologicznemu kriokonserwowanych oocytów i zarodków.

## 2. Mysz

### 2.1. Zamrażanie

#### 2.1.1. Zarodki

W 1972 r. Whittingham i wsp. (2) oraz Wilmut (3) jako pierwsi zamrozili zarodki mysie. Opracowana przez nich metoda była efektywna dla zarodków w stadium od 1 komórki do blastocysty. Wysoka przeżywalność *in vitro* rozmrożonych zarodków została potwierdzona ich rozwojem *in vivo*. Najważniejszymi czynnikami decydującymi o wysokiej przeżywalności zarodków były: wolne zamrażanie utrzymujące się w granicach od 0,2 do 2,0°C/min, wolne rozmrażanie wynoszące od 4 do 25°C/min oraz użycie dwumetylosulfotlenku (DMSO) jako związku osłaniającego. Dodawanie tego związku do zarodków było jednostopniowe, natomiast uznany za optymalny czas ekwilibracji wahał się od 5 do 15 min. Usuwanie związku osłaniającego przy wolnym rozmrażaniu zarodków przeprowadzano w trzech etapach.

Podane postępowanie umożliwiało zamrażanie zarówno nie zapłodnionych komórek jajowych myszy jak i zarodków tego gatunku, niezależnie od stadium rozwoju. Najczęściej jednak zamrażane były zarodki w stadium 8-komórkowym. Uzyskiwane wyniki przeżywania 8-komórkowych zarodków mysich wolno zamrażanych i rozmrażanych oceniane po rozmrożeniu na podstawie dalszego rozwoju w hodowli *in vitro* wahały się od ponad 50 do ok. 90%. Nieco niższe wyniki przeżywania obserwowano zamrażając zarodki mysie w stadium blastocysty. Średnia efektywność transplantacji układała się na poziomie ok. 40%.

W doświadczeniach przeprowadzonych w kolejnych latach próbowano doskonalić poszczególne elementy opracowanej przez Whittinghama i wsp. (2) metody. Na uwagę zasługują badania dotyczące wpływu roztworu hipertonicznego PBS na zamrażalność zarodków myszy (4), w których wykazano, że użycie roztworu PBS o koncentracji zwiększonej od 10 do 70% powoduje wzrost przeżywalności zamrożonych zarodków. Był on najwyższy przy koncentracji zwiększonej o 20 i 30% i wynosił odpowiednio 16 i 13%.



Istotnym udoskonaleniem metodycznym, mającym konsekwencje praktyczne, było wprowadzenie jednostopniowego usuwania związku osłaniającego za pomocą roztworu sacharozy (5). Sacharoza jest związkiem, który nie przenika do wnętrza komórki i może utrzymywać wysokie ciśnienie osmotyczne na zewnątrz niej podczas usuwania związku osłaniającego (6,7). Stwierdzono, że 1,0 M roztwór sacharozy jest optymalny dla zarodków mysich zamrażanych w 1,0 M glicerolu (6).

Obok doświadczeń nad doskonaleniem metody prowadzono wiele obserwacji pogłębiających znajomość zjawisk związanych z konserwacją zarodków w niskich temperaturach. Do ważniejszych należy zaliczyć obserwacje nad przeżywaniem zarodków ocenianych bezpośrednio po zamrożeniu oraz po ich przechowywaniu przez kilka lat w ciekłym azocie. Stwierdzono, że czas przechowywania zarodków w ciekłym azocie nie wpływa na zachowanie ich żywotności. Otrzymano również potomstwo po transplantacji zarodków mysich przechowywanych w ciekłym azocie przez ponad 4 lata (8).

Przez wiele lat zarodki mysie stanowiły najczęstszy obiekt odniesienia dla badań nad zamrażaniem zarodków innych gatunków ssaków. Od pewnego jednak czasu obserwuje się większe zainteresowanie takimi zwierzętami jak królik czy owca jako obiektami modelowymi do badań z zakresu kriokonserwacji oocytów i zarodków.

### 2.1.2. Oocyty

Próby zastosowania do zamrażania oocytów mysich metody opracowanej dla zarodków uwieńczone zostały sukcesem. Uzyskano płody i potomstwo z oocytów zamrożonych i po rozmrożeniu zapłodnionych *in vitro*. Należy jednak podkreślić, że wyniki te układały się na dość niskim poziomie, gdyż tylko z 6 do 14% mrożonych oocytów uzyskuje się potomstwo (9). Stosunkowo niedawno stwierdzono również, że izolowane pierwotne pęcherzyki mysie mogą być kriokonserwowane, a po ich zapłodnieniu *in vitro* otrzymać można normalne potomstwo (10).

## 2.2. Witryfikacja

### 2.2.1. Zarodki

Metoda witryfikacji została po raz pierwszy zastosowana do kriokonserwacji zarodków myszy przez Ralla i Fahy w 1985 r. (11). Zarodki mysie w stadium 8-komórkowym poddawano witryfikacji w mieszaninie związków osłaniających, penetrujących i nie penetrujących, zawierającej: DMSO, acetamid, glikol propylenowy i glikol polietylenowy. Postępowanie polegało na trzystopniowej ekspozycji zarodków we wzrastających koncentracjach związków osłaniających o temp. 4°C, a następnie przelożeniu zarodków do mieszaniny witryfikacyjnej o zróżnicowanej koncentracji związków osłaniających (od 75 do 100%). Po 10 minutach następowało schładzanie zarodków metodą



wolną lub szybką do temperatury ciekłego azotu. Najwyższy odsetek zarodków rozwijających się *in vitro* (80 i 87%) stwierdzono w przypadku użycia mieszaniny witrifikacyjnej o koncentracji 90 i 100%, zarówno podczas szybkiego jak i wolnego schładzania.

Podobną przeżywalność *in vitro* w przypadku witrifikacji zarodków w stadium moruli czy blastocysty uzyskiwali inni autorzy stosując następujące mieszaniny witrifikacyjne: glicerol + propandiol (12-15), glikol etylenowy + DMSO (16), glikol etylenowy + fikal + sacharoza (17-19) czy też mieszaninę zaproponowaną przez Ralla i Fahy (20).

Uzyskiwana efektywność witrifikacji zarodków mysich zależy nie tylko od składu mieszaniny witrifikacyjnej, lecz w większym stopniu od stadium rozwoju zarodka poddawanego witrifikacji. Generalnie, zarodki w stadium bardziej zaawansowanym charakteryzują się większą podatnością na witrifikację. Stwierdzono, że optymalnym stadium witrifikowanego zarodka jest morula, gdyż osiągnięta przeżywalność *in vitro* waha się od 75 do 100% (12-18). Uzyskiwany wysoki odsetek witrifikowanych zarodków mysich rozwijających się *in vitro* nie odpowiada odsetkowi zarodków rozwijających się *in vivo*. Po transplantacji zarodków mysich przeżywa ich zazwyczaj od 30 do 50% (12,14,16,17,21,22).

## 2.2.2. Oocyty

Oocyty mysie, przeciwieństwo niż oocyty innych gatunków ssaków, są podatne na witrifikację w stopniu porównywalnym do zarodków. Stosując procedurę witrifikacji opracowaną przez Ralla i Fahy (11) można uzyskać po witrifikacji od ok. 50 (23,24) do 80-90% oocytów morfologicznie normalnych (25). Podobnie wyniki przenoszenia zarodków uzyskanych w wyniku zapłodnienia kriokonserwowanych oocytów są również zadowalające, gdyż wynoszą ok. 50% (25,26).

Oocyty w stadium metafazy II są bardziej podatne na witrifikację w mieszaninie zaproponowanej przez Ralla i Fahy (11), natomiast oocyty niedojrzałe lepiej poddają się witrifikacji w roztworach opartych na glikolu etylenowym i fikolu (22).

Podsumowując można stwierdzić, że obecne metody witrifikacji pozwalają na uzyskanie zadowalających wyników kriokonserwacji zarówno niedojrzałych jak i dojrzałych mysich oocytów.

## 3. Królik

### 3.1. Zamrażanie

#### 3.1.1. Zarodki

Pierwsze prace dotyczące zamrażania zarodków króliczych zostały opublikowane w połowie lat siedemdziesiątych. (27-29). Zastosowane w tych bada-



niach postępowanie było zbliżone do opracowanego przez Whittinghama i wsp. (2) dla zamrażania zarodków mysich. Głównym elementem różniącym te procedury było użycie szybszego w porównaniu do zamrażania zarodków mysich tempa schładzania. Wynosiło ono zamiast  $0,3^{\circ}\text{C}$  około  $1^{\circ}\text{C}/\text{min}$ . Wymóg szybszego tempa schładzania zamrażanych zarodków króliczych został potwierdzony w pracach opublikowanych przez kolejnych autorów (30,32-34).

Zarodki królicze, w odróżnieniu od zarodków mysich, charakteryzują się zróżnicowaną podatnością na zamrażanie w zależności od stadium rozwoju. Wczesne stadia rozwojowe zarodków królika przeżywają po mrożeniu znacznie gorzej niż zarodki w stadium moruli. Z badań nad zamrażaniem morul króliczych wynikało ponadto, że mimo osiągania wysokiej przeżywalności *in vitro* wynoszącej ok. 80%, odsetek zarodków przeżywających *in vivo* był znacznie niższy, wynosił bowiem od kilkunastu do 30% (28,29). W próbach poprawienia przeżywalności *in vivo* poprzez wprowadzenie surowicy króliczej (31) jako składnika medium do zamrażania lub zastosowanie wyższej temperatury dodawania związku osłaniającego (29) dowiedziono, że istnieje możliwość uzyskania przeżywalności *in vivo* na znacznie wyższym poziomie (30-70%).

Stwierdzenie możliwości znacznego przyspieszenia tempa schładzania zarodków króliczych od  $1^{\circ}\text{C}$  do ok. kilkunastu stopni  $\text{C}/\text{min}$  (32) stało się podstawą do opracowania tzw. dwustopniowej metody zamrażania. Wykazano, że proces zamrażania zarodków króliczych przy zastosowaniu podanego tempa schładzania powinien być kontynuowany jedynie do temperatury  $-30^{\circ}\text{C}$ . Warunkiem skutecznego zamrożenia zarodków przy zastosowaniu wymienionej procedury była wstępna dehydratacja zarodków przed zamrożeniem przy użyciu 0,5 do 1,0 M sacharozy. Zarodki ulegają wówczas obkurczeniu, wskutek czego proces zamrażania może być przeprowadzony w znacznie szybszym tempie. Nadmienić należy również, że w doświadczeniach tych jako związku osłaniającego użyto propandiolu, który, jak się okazało, był korzystniejszym krioprotektantem niż wcześniej stosowany DMSO.

Badania nad dwustopniowym zamrażaniem zarodków króliczych były kontynuowane przez Smorąga i wsp. (33). Doprowadzono w nich do rozpoznania, że optymalną koncentracją sacharozy w dwustopniowej metodzie zamrażania jest roztwór 0,25 M, zaś końcowa temperatura zamrażania przed przełożeniem do ciekłego azotu wynosząca  $-25^{\circ}\text{C}$  okazała się wystarczająca dla uzyskania wysokiej przeżywalności po rozmrożeniu.

We wspomnianych badaniach, jak również w doświadczeniach Renarda i wsp. (32) oraz Landy (30) dowiedziono, że istnieje możliwość uzyskania po rozmrożeniu przeżywalności *in vivo* na tym samym poziomie, jaką osiąga się w przypadku przenoszenia zarodków świeżych.

Z innych doświadczeń nad zamrażaniem zarodków króliczych na uwagę zasługują badania z zastosowaniem skróconego programu zamrażania stosowanego dla zarodków bydłych (35). Z obserwacji tych wynika, że przy takim postępowaniu zarodki królicze tolerują wolniejsze, utrzymujące się w granicach  $0,3^{\circ}\text{C}/\text{min}$  tempo schładzania. Wyniki tych prac nie zostały potwierdzone w innych badaniach.



### 3.1.2. Oocyty

Dotychczas stosunkowo niewiele badań wykonano nad kriokonserwacją oocytów króliczych. Uzyskano wprawdzie potomstwo z oocytów mrożonych i zapłodnionych *in vitro*, jednak efektywność tych prób była bardzo niska (2-6%) (36,37).

## 3.2. Witryfikacja

### 3.2.1. Zarodki

Stwierdzono, że zarodki tego gatunku, podobnie jak zarodki mysie, wykazują znaczne różnice w podatności na witryfikację w zależności od stadium rozwoju. Witryfikując morule królicze uzyskuje się po rozmrożeniu wysoki, bo sięgający od 80 do 100% odsetek zarodków rozwijających się *in vitro* (38-42). Nieco niższe rezultaty przeżywania *in vitro* osiąga się po witryfikacji blastocyst (41,42). Przeżywalność witryfikowanych zarodków w stadium od 1 do 8-16 blastomerów zależy w dużym stopniu od koncentracji związków osłaniających (glicerol + propandiol), będących składnikami mieszanki witryfikacyjnej (41). Zwiększenie tej koncentracji o 10% umożliwiło osiągnięcie wysokiego stopnia przeżywania *in vitro* (blisko 90%) zarodków 8-16-blastomerowych, natomiast w przypadku zarodków 1- i 2-blastomerowych obserwowany wzrost przeżywalności wynosił od 20 do 40% (41). Zjawisko to, jak się wydaje, spowodowane może być zróżnicowaną przepuszczalnością błony cytoplazmatycznej komórek zarodka dla związków osłaniających. Przepuszczalność ta zwiększa się wraz z osiągnięciem przez zarodek bardziej zaawansowanego stadium rozwoju.

Z badań nad wpływem poszczególnych etapów witryfikacji na przeżywalność zarodków wczesnych stadiów (1- i 2-blastomerowych) stwierdzono, że obniżenie przeżywalności w większym stopniu jest następstwem ekwilibracji, ekspozycji w mieszaninie witryfikacyjnej i rozcieńczenia w sacharozie niż samego procesu witryfikacji (43).

Efektywność przenoszenia zarodków króliczych witryfikowanych w mieszaninie glicerolu i propandiolu była niska (od 20 do 25%), ale nie odbiegała znacznie od rezultatów uzyskiwanych po transplantacji zarodków świeżych (39,41). Możliwość osiągnięcia wyższych wyników przeżywalności *in vivo* (60%) wykazali Kasai i wsp. (38), witryfikując zarodki królicze w mieszaninie glikolu etylenowego, fikolu i sacharozы.

Z ostatnich badań (38,44) wynika, że mieszanina witryfikacyjna oparta na glikolu etylenowym, zamiast stosowanej najczęściej mieszanki glicerolu i propandiolu, może być bardziej przydatna do witryfikacji zarodków wczesnych stadiów, które charakteryzują się ograniczoną przepuszczalnością dla glicerolu.

Stwierdzona została również możliwość witryfikacji połówek zarodków króliczych (39). Przeżywalność takich zarodków nie odbiega od przeżywalności całych, witryfikowanych zarodków.



Podsumowując można stwierdzić, że zarodki królicze mogą być z powodzeniem kriokonserwowane za pomocą metody witrifikacji, pod warunkiem że osiągnęły stadium rozwoju 8 blastomerów lub wyższe.

### 3.2.2. Oocyty

Brak doniesień dotyczących witrifikacji oocytów króliczych.

## 4. Owce i kozy

### 4.1. Zamrażanie

#### 4.1.1. Zarodki

Pierwsze skuteczne próby zamrażania zarodków owczych przeprowadzono w połowie lat siedemdziesiątych. Zastosowane metody zamrażania były zbliżone do tych, jakie okazały się skuteczne dla zamrażania zarodków bydłęcych. Procedura obejmowała stopniowe przeprowadzanie zarodków przez wzrastające koncentracje związku osłaniającego, jakim był DMSO do stężenia wynoszącego ok. 1,5 M. Następnie zarodki schładzano do temperatury ok.  $-5$  do  $-7^{\circ}\text{C}$  i wtedy dokonywano posiewania, czyli sztucznie zapoczątkowywano krystalizację zamrażanego płynu z zarodkami, po czym rozpoczynano kontrolowane schładzanie do temp. ok.  $-70^{\circ}\text{C}$ . Po osiągnięciu tej temperatury zarodki przekładano do ciekłego azotu. Rozmrażanie przeprowadzano wolno, tzn. z szybkością kilkunastu stopni na minutę. Bezpośrednio po rozmrożeniu rozpoczynano usuwanie związku osłaniającego. Proces ten był wielostopniowy i przebiegał w sześciu etapach, dzięki czemu zarodki nie doznawały uszkodzeń natury osmotycznej, jakie nastąpiłyby przy jednostopniowym usuwaniu związku osłaniającego. Dzięki zastosowaniu opisanej procedury uzyskiwano 30-60% zarodków rozwijających się *in vitro* (45-47). Metoda ta okazała się skuteczna również dla zamrażania zarodków innych gatunków.

Związkami osłaniającymi najczęściej stosowanymi do zamrażania zarodków owczych były: DMSO (45,48,49), glicerol (49,50) i rzadziej metanol (51). Wyraźny postęp w zamrażaniu zarodków owczych nastąpił kiedy jako związku osłaniającego użyto glikolu etylenowego, substancji łatwiej penetrującej niż stosowane dotąd krioprotektory. Świadczą o tym wyniki transplantacji — 58% (52), 64% (49), 73% (53).

Zarodki owcze odznaczają się dużą wrażliwością na zmiany termiczne, z tego względu dodawanie i usuwanie związku osłaniającego przeprowadza się w temperaturze pokojowej, unikając dzięki temu szybkich zmian osmotycznych i stwarzając możliwość łatwiejszego wnikania związku osłaniającego do komórek zarodka.

Jednostopniowe usuwanie związku osłaniającego za pomocą sacharozы (7) wprowadzone wcześniej do rozmrażania zarodków mysich dało się z po-



wodzeniem zastosować do zarodków owczych (54). Stwierdzono, że 1,0 M roztwór sacharozy jest optymalny dla zarodków zamrażanych w 1,4 lub 2,0 M glicerolu (55). Użycie sacharozy zmniejsza ryzyko wystąpienia uszkodzeń spowodowanych szkodliwym oddziaływaniem związku osłaniającego, w tym również uszkodzeń natury osmotycznej na skutek zmian koncentracji.

Zarodki owcze, podobnie jak zarodki innych gatunków ssaków, charakteryzują się zróżnicowaną podatnością na zamrażanie w zależności od stadium rozwoju (56). Najwyższą przeżywalność *in vitro* w granicach od 60 do 80% osiągają zarodki w stadium blastocysty (55,57,58). Dużo niższe wyniki przeżywalności w granicach od 25 do 45% obserwuje się zamrażając zarodki w stadium wczesnej moruli i moruli (58). Należy jednak zaznaczyć, że są autorzy, którzy uważają, iż stadium rozwoju zarodków owczych nie ma znaczącego wpływu na efektywność zamrażania (53,55).

Z nielicznych doświadczeń nad zamrażaniem zarodków kozy wynika, że wykazują one podobną podatność na zamrażanie jak zarodki owcze (59-61). Ponadto stwierdzono, że z punktu widzenia zamrażania optymalnym stadium rozwoju zarodka koziego jest wylęga blastocysta. Potwierdzone to zostało zarówno w badaniach *in vitro* jak *in vivo* (62,63).

#### 4.1.2. Oocyty

Dotychczas brak doniesień na temat mrożenia oocytów owczych i kozich.

### 4.2. Witryfikacja

#### 4.2.1. Zarodki

Pierwsze udane próby witryfikacji zarodków owczych zostały przeprowadzone przez Gajdę i wsp. (64). Zastosowana procedura witryfikacji opierająca się na użyciu mieszaniny glicerolu i propandiolu pozwoliła uzyskać przeżywalność *in vivo* porównywalną z przeżywalnością zarodków zamrażanych. Możliwość pełnego rozwoju *in vivo* witryfikowanych zarodków owczych uwarunkowana była przeniesieniem zarodków do biorecipientów bezpośrednio (do 2 min) po rozmrożeniu i usunięciu środka osłaniającego. Podobne obserwacje dotyczące transplantacji witryfikowanych zarodków natychmiast po rozmrożeniu zanotowali na zarodkach bydłych Massip i wsp. (65).

Dotychczas do witryfikacji zarodków owczych używano takich związków osłaniających jak glikol propylenowy, glikol etylenowy i glicerol (66-69). W badaniach przeprowadzonych przez Szella i wsp. (68) wykazano, że zarodki owcze witryfikowane w mieszaninie glicerolu i glikolu propylenowego są bardziej podatne na witryfikację w stadium blastocysty niż moruli. Potwierdzono to w uzyskanych wynikach przeżywalności, które wynosiły 36 i 70% *in vitro* oraz 11 i 32% *in vivo* odpowiednio dla morul i blastocyst (68).

Zarodki owcze witryfikowano również z powodzeniem w wysoko skoncentrowanym medium zawierającym glicerol z albuminą surowicy bydłej (69).



Obecny w medium glicerol, zaliczany do związków trudniej przenikających do komórki, jest czynnikiem osłaniającym zarodki schładzane do niskich temperatur, natomiast albumina jako wysokocząsteczkowy polimer ma właściwości stabilizujące błony cytoplazmatyczne, zwłaszcza podczas zamrażania (69). Uzyskany w tych badaniach odsetek zarodków rozwijających się *in vitro* (60% blastocyst ekspandujących, 40% blastocyst wylęgłych) był porównywalny z wynikami przeżywalności zarodków zamrażanych metodą jednostopniową.

Obserwacje Naitana i wsp. (70) nad zastosowaniem dwustopniowej ekwilibracji przed witrifikacją umożliwiły uzyskanie rozwoju zarówno *in vitro* (ok. 80%) jak *in vivo* (od ok. 40 do 80%) na dość wysokim poziomie.

We wszystkich doświadczeniach nad witrifikacją zarodków owczych medium witrifikacyjne było usuwane z komórek jednostopniowo za pomocą roztworu sacharozy.

Do tej pory opublikowana została tylko jedna praca dotycząca witrifikacji zarodków kozich (71). Autorzy uzyskali potomstwo po transplantacji zarówno morul jak i blastocyst witrifikowanych w mieszaninie glicerolu i propandiolu.

Przedstawione procedury witrifikacji zarodków owczych i kozich, pozwalające na uzyskanie ograniczonego odsetka zarodków rozwijających się *in vitro* oraz *in vivo*, nie są jeszcze na tyle zadowalające, aby mogły znaleźć zastosowanie w praktyce.

## 5. Świnia

### 5.1. Zamrażanie

#### 5.1.1. Zarodki

Zarodki świni są szczególnie trudno podatne na schładzanie i zamrażanie. Zostało to stwierdzone już w pierwszych wykonanych w połowie lat siedemdziesiątych pracach dotyczących konserwacji zarodków tego gatunku (72,73). Wykazano wówczas, że zarodki świni w stadium rozwoju od 4 blastomerów do blastocysty nie przeżywają schładzania nawet w zakresie temperatur plusowych. Zamieranie zarodków następowało między +10 a +15°C (73,74). W kolejnych badaniach wykazano, że wrażliwość zarodków świni na schładzanie uzależniona jest w większym stopniu niż to ma miejsce u innych gatunków, od stadium rozwoju zarodka, a także od tego czy rozwój zarodka następował *in vitro* czy *in vivo* (75). Stwierdzono, 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* (76).

Próby zastosowania środków osłaniających takich jak glicerol lub DMSO przy ochładzaniu zarodków świni nie dawały pozytywnych efektów (77,78). Przez długi czas nie udawało się też zamrozić zarodków świni przy zastosowaniu metod pozwalających na skuteczne zamrażanie zarodków takich ga-



tunków zwierząt gospodarskich jak: bydło, owce, kozy czy konie. Przyczyną niepowodzeń jest prawdopodobnie wysoka zawartość lipidów w cytoplazmie zarodków świni (79). W próbach usuwania związków lipidowych z zarodków przed ich zamrażaniem wykazano, że zarodki wczesnych stadiów (od 1 do 4 blastomerów) tolerują ochładzanie do  $+4^{\circ}\text{C}$ , a nawet przeżywają zamrażanie w ciekłym azocie (80). Stwierdzono ponadto, że wraz z osiąganiem przez zarodek świni bardziej zaawansowanego stadium rozwoju zawartość lipidów maleje (80), co może być związane z mniejszą wrażliwością na ochładzanie zarodków w stadium blastocysty. Potwierdzają to wcześniejsze obserwacje (76), że zarodki świni w bardziej zaawansowanych stadiach rozwoju (ekspandującej i wylęgłej blastocysty) mogą przeżywać w 60-80% zamrażanie do  $-20^{\circ}\text{C}$ .

Pierwsze sukcesy, jakie zanotowano w kriokonserwacji zarodków świni były przede wszystkim rezultatem użycia do zamrażania zarodków w odpowiednim stadium rozwoju, tj. ekspandującej lub wylęgłej blastocysty (81,82). Procedura zamrażania zakładała kontrolowane wolne schładzanie z szybkością  $0,3^{\circ}\text{C}/\text{min}$  i użycie glicerolu jako związku osłaniającego. Efektywność tych pierwszych prób była dość niska, gdyż 9 prosiąt, urodzonych w wyniku przeprowadzonych badań, uzyskano po transplantacji 77 kriokonserwowanych zarodków.

W kilku następnych pracach nad zamrażaniem zarodków świni liczba użytych do doświadczeń zarodków była stosunkowo niska, a przeżywalność zamrożonych zarodków oceniana była na podstawie ich rozwoju *in vitro* (83-85).

Na uwagę zasługują próby zamrażania zarodków świni w glicerolu z dodatkiem żółtka jaja kurzego zakończone urodzeniem 1 prosięcia po transplantacji 8 kriokonserwowanych zarodków (86).

### 5.1.1. Oocyty

W nielicznych badaniach dotyczących kriokonserwacji oocytów świni poza poszukiwaniem odpowiednich warunków użycia związków osłaniających (87,88) prowadzone są również próby wykorzystania w procesie zamrażania tzw. substancji antymrożeńowych (89,90). Grupa tych związków jest przedmiotem badań kriobiologicznych ostatnich lat (91-93).

## 5.2. Witryfikacja

### 5.2.1. Zarodki

Ostatnio doniesiono o skutecznej witryfikacji zarodków świni w stadium od ekspandującej do wylęgłej blastocysty (94). Autorzy zastosowali 4 mieszaniny witryfikacyjne oraz ekwilibrację jedno- lub czterostopniową. Nie obserwowano różnicy między mieszaninami witryfikacyjnymi, natomiast ekwilibracja czterostopniowa okazała się korzystniejsza niż jednostopniowa. Po rozmrożeniu uzyskano rozwój *in vitro* niewielkiego odsetka zarodków. W tym



kontekście niezwykle zachęcające są wyniki badań opublikowane ostatnio przez Kuwayama i wsp. (95). Autorzy ci wityfikowali zarodki świńskie znajdujące się w stadium rozwoju od moruli do wylęgłej blastocysty, stwierdzając wysoki, bo wynoszący od 20 do 100% przeżywania *in vitro*. Jeśli wyniki te znajdą potwierdzenie również w próbach biologicznych może to oznaczać, że mamy do czynienia z przełamaniem bariery w pracach nad kriokonserwacją zarodków świńskich.

### 5.2.2. Oocyty

Stwierdzono, że oocyty poddane wityfikacji po usunięciu związków lipidowych mogą być skutecznie zapłodnione *in vitro* i rozwijać się do stadium 8-komórek-moruli (96).

Z doświadczeń nad wityfikacją niedojrzałych oocytów świni w mieszaninie glicerolu i surowicy wynika, że po rozmrożeniu 21% oocytów osiągało dojrzałość *in vitro* (97).

Z przedstawionego przeglądu wynika, że nie opracowano do tej pory efektywnych metod kriokonserwacji zarodków i oocytów świni. Zarówno bowiem stosowane metody zamrażania jak i wityfikacji, poza wspomnianymi badaniami Kuwayama i wsp. (95), nie przyniosły dotąd satysfakcjonujących rozwiązań.

## 6. Konie

### 6.1. Zamrażanie

#### 6.1.1. Zarodki

Niewiele, w porównaniu do innych gatunków ssaków, opublikowano prac dotyczących kriokonserwacji zarodków klaczy. Wiąże się to z ograniczoną możliwością uzyskiwania większej liczby zarodków ze względu na niską rozrodczość tego gatunku. Ponieważ nie udało się dotąd opracować skutecznych metod wywoływania superowulacji u klaczy, w ciągu jednego sezonu uzyskuje się od 1 klaczy średnio 2-3 zarodki (98). Potencjalnym źródłem zwiększenia plenności u klaczy, jak się wydaje, mogą być w przyszłości oocyty pobierane z pęcherzyków jajnikowych przyżyciowo lub po uboju (99).

Zarodki klaczy okazały się bardziej wrażliwe na działanie niskich temperatur niż zarodki innych gatunków ssaków. Stwierdzono, że zarodki tego gatunku są szczególnie wrażliwe na różnice w ciśnieniu osmotycznym podczas poszczególnych etapów schładzania i rozmrażania (100,101). Pierwsze źrebięta po transplantacji zarodków zamrożonych w ciekłym azocie uzyskano dopiero na początku lat osiemdziesiątych (102). Procedura zamrażania oparta była na zmodyfikowanej metodzie Willadsena i wsp. (103) opracowanej dla zarodków bydłych i owczych. Jako środka osłaniającego używano glicerolu,



który dodawano do zarodków wielostopniowo. Schładzanie od temperatury pokojowej do  $-6^{\circ}\text{C}$  przeprowadzano z szybkością  $1^{\circ}\text{C}/\text{min}$ . Po zainicjowaniu krystalizacji ( $-6^{\circ}\text{C}$ ) zarodki schładzano do temp.  $-33^{\circ}\text{C}$  z szybkością  $0,3^{\circ}\text{C}/\text{min}$  i przetrzymywano w tej temperaturze przez 15 minut. Po tym czasie zarodki przekładano do ciekłego azotu. Rozmrażanie odbywało się w łaźni wodnej o temp.  $37^{\circ}\text{C}$ , a usuwanie związku osłaniającego było wielostopniowe.

Kolejnego udanego eksperymentu konserwacji zarodków w ciekłym azocie dokonano podczas międzynarodowej wymiany między Polską a Anglią w 1985 r. W wyniku tej współpracy urodziło się zrebicie (104).

Najczęściej używanym związkiem osłaniającym dla zamrażania zarodków klaczy jest glicerol (102,105,106), rzadziej propandiol (107). Podczas niedawnych obserwacji wykazano, że glikol etylenowy łatwiej niż glicerol przenika do zarodków klaczy w stadium blastocysty (108).

Wyniki przeżywalności *in vitro* zamrażanych zarodków klaczy są porównywalne z uzyskiwanymi przy zamrażaniu zarodków bydłęcych, pod warunkiem, że zarodki przeznaczone do zamrażania znajdują się w stadium moruli lub wczesnej blastocysty (102,105,109). Natomiast wyniki transplantacji nie przekraczają 15%.

### 6.1.2. Oocyty

W jedynym jak dotychczas doniesieniu (110) o kriokonserwacji oocytów klaczy badano wpływ zamrażania niedojrzałych oocytów w 3 różnych związkach osłaniających na ich przeżywalność. Stwierdzono, że glikol etylenowy i propandiol są korzystniejszymi niż glicerol środkami osłaniającymi dla oocytów klaczy, gdyż tylko w nich zamrażane oocyty osiągały stadium metafazy II. Ponadto wykazano, że oocyty mrożone w glikolu etylenowym były penetrowane przez plemniki i posiadały zdolność tworzenia przedjadrzy.

## 6.2. Witryfikacja

### 6.2.1. Zarodki

Prace dotyczące witryfikacji zarodków koni prowadzone były dotychczas tylko w jednym ośrodku badawczym. W 1994 r. Hochi i wsp. (111) donieśli o uzyskaniu ciąży po przeniesieniu witryfikowanych blastocyst. Zastosowana mieszanina witryfikacyjna, opracowana dla zarodków mysich (17) oparta była na glikolu etylenowym, fikolu i sacharozie. W badaniach tych stwierdzono konieczność wielostopniowej ekwilibracji zarodków przed ich witryfikacją.



## 7. Bydło

### 7.1. Zamrażanie

#### 7.1.1. Zarodki

Duże zainteresowanie kriokonserwacją zarodków bydłych wynika z jej zastosowania w metodzie przenoszenia zarodków, która w hodowli bydła jest wykorzystywana na dość znaczącą skalę.

Opracowanie skutecznej metody mrożenia zarodków mysich pozwoliło w krótkim czasie wdrożyć również metodę mrożenia zarodków bydłych. Pierwsze cielę urodziło się w 1973 r. po transplantacji mrożonych zarodków (112).

Głównym celem badań nad kriokonserwacją zarodków bydłych było ustalenie warunków kriokonserwacji pozwalających uzyskać pełną zdolność rozwoju zarodka po jego rozmrożeniu. Najbardziej istotnymi etapami procesu zamrażania, które kolejno zostaną omówione, są: dodawanie związku osłaniającego, schładzanie, inicjowanie krystalizacji, kontrolowane zamrażanie i przechowywanie w ciekłym azocie (-196°C), rozmrażanie, usuwanie związku osłaniającego.

Najczęściej używanymi związkami osłaniającymi przy zamrażaniu zarodków bydłych były DMSO, glicerol i glikol etylenowy, rzadziej propandiol. Nie wykazano różnic w przeżywalności zarodków zamrażanych w glikolu etylenowym, DMSO czy glicerolu (113,114) jak również w mieszaninie glicerolu i DMSO (115,116). Niektórzy autorzy (117) obserwowali jednak wyższą przeżywalność zarodków zamrażanych w glikolu etylenowym niż DMSO, a z wcześniejszych badań przeprowadzonych przez Lehn-Jensen i Greve (118) wynikało, że mieszanina glicerolu i DMSO nie była efektywna dla zamrażania zarodków bydłych. Stwierdzono również, że glicerol w kombinacji z rafinozą może poprawiać wyniki przeżywalności zarówno *in vitro* jak i *in vivo* (119). Także dodatek solcoserylu do medium przed mrożeniem wpływał pozytywnie na przeżywalność zarodków wczesnych stadiów (120). Obecnie uważa się, że do zamrażania zarodków bydłych najbardziej przydatnymi związkami osłaniającymi są glikol etylenowy i glicerol.

Początkowo związek osłaniający dodawano do zarodków wielostopniowo, najczęściej w 4 lub 6 etapach (117,121). Manipulacje te przeprowadzano zazwyczaj w temperaturze pokojowej, dzięki czemu unikano szybkich zmian osmotycznych oraz stwarzano możliwości łatwiejszego wnikania związku osłaniającego do komórek zarodka. Z doświadczeń przeprowadzonych w następnych latach wynikało, że przeżywalność zarodków po rozmrożeniu była podobna zarówno przy jedno- jak i wielostopniowym dodawaniu związku osłaniającego (122-124).

Kolejnym etapem postępowania jest schładzanie zarodków od temperatury pokojowej do temperatury posiewania, najczęściej z szybkością wynoszącą od 1 do 2°C/min. Taka procedura jest niezbędna dla uniknięcia szoku chł-



dowego, który mógłby nastąpić przy gwałtownym schładzaniu zarodków. Stwierdzona w późniejszych badaniach niewrażliwość morul i blastocyst bydłych na zmiany termiczne w zakresie od temperatury pokojowej do kilku stopni poniżej 0°C pozwoliła uprościć postępowanie. Istnieje nawet możliwość bezpośredniego przekładania zarodków z temperatury pokojowej do ok. -6°C (125,126).

Następnym etapem związanym z zamrażaniem jest posiewanie, czyli inicjowanie krystalizacji lodu w płynie otaczającym zarodki. Biorąc pod uwagę możliwości techniczne wywoływania samej krystalizacji oraz uzyskiwane wyniki, najodpowiedniejsze jest posiewanie w temperaturze około -5, -6°C (127,128).

Po zainicjowaniu krystalizacji zarodki zamraża się z określoną szybkością. W pierwszych doświadczeniach nad zamrażaniem zarodków bydłych stosowano wolną procedurę zamrażania (szybkość schładzania 1°C/min). Wydawało się, że takie postępowanie jest niezbędne dla uniknięcia szoku chładowego, który mógłby nastąpić przy gwałtownym schładzaniu zarodków. W metodzie tej zarodki przekładano do ciekłego azotu po osiągnięciu temperatury od -60 do -120°C, uzyskując w ten sposób maksymalną ich dehydratację. W kolejnych badaniach wprowadzono skrócony program zamrażania poprzez podwyższenie końcowej temperatury zamrażania zarodków do -30, -35°C przed ich położeniem do ciekłego azotu. Uzyskiwana przeżywalność zarodków zamrażanych metodą wolną lub szybko jest podobna (129).

Najlepsze wyniki przeżywania zarodków zamrażanych metodą wolną (wolne schładzanie do -60°C) można osiągnąć, kiedy są one wolno rozmrażane (ok. 20°C/min), natomiast zarodki przekładane do ciekłego azotu w wyższych temperaturach minusowych (-30 do -40°C) wymagają szybkiego rozmrażania (ok. 300°C/min).

Rozmrażanie zarodków przeprowadza się zazwyczaj w łaźni wodnej o temp. 35 i 20°C lub w powietrzu o temperaturze pokojowej. Wyższe wyniki przeżywania podczas rozmrażania w temp. 20°C (81%) niż 37°C (50%) osiągnęli Cacheino i wsp. (130). Zaobserwowano, że krótkie rozmrażanie w powietrzu (6 s), a później w łaźni wodnej minimalizuje uszkodzenia osłonki przejrzystej zarodków (131), zaś rozmrażanie tylko w powietrzu redukuje te uszkodzenia do zera (132).

Niezbędnym zabiegiem jest usunięcie związku osłaniającego z komórek rozmrożonego zarodka. Dla uniknięcia szoku osmotycznego czynność ta była wykonywana stopniowo. Praktycznie oznaczało to przeniesienie zarodka przez kilka roztworów o zmniejszającej się koncentracji związku osłaniającego. Zastosowanie sacharozy (133,134) do rozmrażania zarodków zamrażanych w słonce umożliwiło zarówno bezszokowe usuwanie związku osłaniającego, jak i bezpośrednią transplantację zarodków. Uzyskiwany odsetek ciąży wynosił 36,7% po rozmrażaniu w słonce i bezpośredniej transplantacji i 45,2% po wielostopniowym rozmrażaniu (135). Chupin i wsp. (123) nie stwierdzili różnicy między tymi dwoma metodami usuwania związku osłaniającego. Nie obserwowano również różnicy w przeżywalności zarodków po zastosowaniu sacharozy do jedno- lub wielostopniowego usuwania związku osłaniającego



(122,136-138). Natomiast Seok i wsp. (139) uzyskali wyższy odsetek ciąży po transplantacji zarodków rozmrażanych za pomocą sacharozy metodą 6-stopniową (36,7%) niż metodą 2-stopniową (16,7%).

Optymalna koncentracja sacharozy w roztworze do jednostopniowego usuwania związku osłaniającego uzależniona jest od jego stężenia w płynie do zamrażania. Wykazano, że roztwór 1 M sacharozy jest optymalny do jednostopniowego usuwania związku osłaniającego z zarodków bydłych zamrażanych w 1,4 lub 2,0 M glicerolu (140).

Jednostopniowe usuwanie związków osłaniających przy użyciu sacharozy było kolejnym istotnym osiągnięciem w uproszczeniu metody zamrażania zarodków bydłych.

Czynnikiem rozstrzygającym o wprowadzeniu zamrażania do praktyki jest efektywność mierzona odsetkiem rozwijających się po rozmrożeniu *in vitro* zarodków. Wolne zamrażanie i rozmrażanie oraz zastosowanie DMSO jako związku osłaniającego pozwoliło osiągnąć rozwój *in vitro* na poziomie od 30 do 60%. Po transplantacji rozwijało się ok. 50% zamrożonych zarodków (141).

Zastąpienie DMSO glicerolem czy też glikolem etylenowym i wprowadzenie skróconego programu rozmrażania pozwoliło na poprawienie tych wyników. Można przyjąć, że wyniki przenoszenia mrożonych zarodków bydłych są o ok. 10-20% niższe od tych, jakie uzyskuje się po przeniesieniu zarodków świeżych.

Podana efektywność zamrażania zarodków bydłych odnosi się do zarodków w stadium późnej moruli i wczesnej blastocysty. Wyniki zamrażania zarodków znajdujących się we wcześniejszych stadiach rozwojowych (od zygoty do moruli) są na dużo niższym poziomie i wymagają przeprowadzenia dalszych badań.

W związku z możliwością uzyskiwania bliźniąt metodą dzielenia zarodków pojawiła się potrzeba konserwacji „połówek” zarodków. Na szczególną uwagę zasługują badania przeprowadzone przez Niemanna i wsp. (142), którzy osiągnęli stosunkowo wysoki, bo wynoszący ponad 40% odsetek rozwijających się „połówek” zarodków bydłych, umieszczonych przed mrożeniem w dodatkowych osłonkach przejrzystych. Jednak problem nie został rozwiązany w stopniu zadowalającym, gdyż do tej pory nie opracowano jeszcze satysfakcjonującej metody kriokonserwacji dzielonych zarodków bydłych. Wiadomo, że „połówki” zarodków zawierają mniej niż połowę komórek zarodka całego. Straty komórkowe, które są wynikiem zamrażania i rozmrażania połówek zarodków prowadzą do dalszej redukcji liczby komórek w dzielonych zarodkach, co w rezultacie powoduje, że ich zdolność implantacyjna jest niezadowalająca.

Opracowanie efektywnych metod zapłodnienia *in vitro* wzbudziło zainteresowanie kriokonserwacją zarodków uzyskanych tą metodą (IVMFC). W badaniach przeprowadzonych w tym zakresie wskazuje się na możliwość zamrażania takich zarodków z zastosowaniem procedur identycznych jak dla zarodków uzyskanych *in vivo*. Jednakże efektywność mrożenia zarodków otrzymanych techniką IVMFC jest niższa w porównaniu do zarodków uzyskanych *in vivo*. Przypuszcza się, że to zróżnicowanie związane jest z jednej



strony z zawartością lipidów (143), z drugiej zaś z właściwościami osłonki przejrzystej (144), wykazującej różnice między zarodkami otrzymanymi w wyniku zapłodnienia *in vitro* i *in vivo*. Wykazano, że osłonka przejrzysta zarodków uzyskanych *in vitro* w porównaniu z zarodkami z *in vivo* jest łatwiej trawiona przez enzymy, np. pronazę (145). Wykazano również, że przeżywalność po mrożeniu zarodków z *in vitro* zależy od tego, czy hodowlę prowadzono w pożywkach syntetycznych Menezo B2 lub TCM 199 (145) czy też we współhodowli z komórkami nabłonka jajowodowego lub komórkami granulocy (143). Oznacza to, że wyższa efektywność zamrażania zarodków uzyskanych *in vitro* zależec będzie w większym stopniu od udoskonalenia technologii pozaustrojowego otrzymywania zarodków niż metody ich kriokonserwacji.

### 7.1.2. Oocyty

Efektywność zamrażania oocytów bydłych jest dość niska: wolne zamrażanie umożliwia rozwój do stadium 2-blastomerów nie więcej niż 13% oocytów (146,147). Niska przeżywalność mrożonych oocytów związana jest prawdopodobnie ze specyfiką procesu zamrażania (148). Ważnym czynnikiem decydującym o efektywności zamrażania jest rodzaj użytego związku osłaniającego. Stwierdzono, że DMSO i 1,2-propandiol są odpowiednimi krioprotektorami dla zamrażania oocytów dojrzałych *in vitro* (149). otrzymano również potomstwo po transplantacji zarodków uzyskanych z dojrzałych *in vitro* oocytów zamrożonych w propandiolu (150). Natomiast w badaniach przeprowadzonych przez Limę i wsp. (147) wykazano, że oocyty dojrzałe *in vitro* mogą rozwijać się po zapłodnieniu do stadium blastocysty, jeżeli są zamrażane w glicerolu. Oocyty niedojrzałe (stadium GV) zamrażano efektywnie w propandiolu w kombinacji z trehalozą (151). Dodatek PVP do zamrażania GV oocytów wpływał korzystnie na liczbę uzyskanych blastocyst (152).

## 7.2. Witryfikacja

### 7.2.1. Zarodki

Zarodki bydłce zostały po raz pierwszy zwitryfikowane (153) przy zastosowaniu procedury opracowanej dla zarodków mysich (12). Mieszanina witryfikacyjna składała się z 25% glicerolu + 25% 1,2-propandiolu. Usuwanie związków osłaniających po rozmrożeniu było jednostopniowe, przy użyciu roztworu 1 M sacharozы. Efektywność transplantacji przy zastosowaniu opisanej metody wynosiła od 20 do 50% (153-155). Metoda ta była efektywna dla zarodków w stadium moruli, podczas gdy nie przeżyła żadna z witryfikowanych blastocyst. Przypuszcza się, że blastocysty są bardziej wrażliwe niż morule na wysoką koncentrację propandiolu w mieszaninie witryfikacyjnej. 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 witryfikacji polegające na wy-



eliminowaniu z mieszaniny ekwilibracyjnej propandiolu pozwoliły na skuteczną witrifikację blastocyst bydłecych (156), choć obserwowana przeżywalność *in vitro* takich blastocyst była niezbyt wysoka (57,1%).

Zastosowanie do witrifikacji morul bydłecych mieszaniny witrifikacyjnej składającej się z DMSO, acetamidu, glikolu propylenowego i glikolu etylenowego (157,158) pozwoliło na uzyskanie po transplantacji potomstwa (154). Ponadto stwierdzono, że spośród wielu czynników wpływających na efekty przenoszenia witrifikowanych zarodków ważną rolę odgrywa czas między uzyskaniem zarodków, a ich witrifikacją, który nie powinien przekraczać 1 godziny (154). Z kolei aby uzyskać jak najlepsze rezultaty transplantacji witrifikowanych zarodków konieczna jest ostra selekcja dawczyń i biorczyń zarodków, jak również bardzo dokładna ocena morfologiczna zarodków przed witrifikacją i po rozmrożeniu (154).

Jednym z ważnych czynników wpływających na przeżywalność witrifikowanych zarodków jest ich ekwilibracja przed witrifikacją. Aby uniknąć niekorzystnego wpływu wysokich koncentracji związków osłaniających, zarodki poddaje się ekwilibracji wielostopniowej. W przeprowadzonych własnych doświadczeniach (155) z zarodkami bydłecymi ekwilibrowanymi trójstopniowo w mieszaninie glicerolu i propandiolu obserwowano wysoką przeżywalność zarodków zarówno *in vitro* (90%) jak i *in vivo* (77,8%). Obserwacje te potwierdzają wyniki uzyskane przez Kuwayama i wsp. (159), którzy zastosowali wielostopniową ekwilibrację do witrifikacji blastocyst uzyskanych *in vitro*. Autorzy ci stosując 1- lub 2-stopniową procedurę ekwilibracji uzyskiwali niski odsetek zarodków rozwijających się po rozmrożeniu, podczas gdy po 4-, 8- lub 16-stopniowej ekwilibracji stwierdzano wysoką przeżywalność *in vitro*.

Siedmiodniowe zarodki bydłące były również z powodzeniem witrifikowane w mieszaninie glicerolu, płodowej surowicy bydłeczej i sacharozie przy zastosowaniu procedury bezpośredniego wkraplania zarodków do ciekłego azotu (160). Efektywność transplantacji wynosiła około 50%.

W poszukiwaniu optymalnej mieszaniny witrifikacyjnej dla zarodków bydłecych, Mahmoudzadeh i wsp. (161) przeprowadzili badania porównawcze trzech różnych mediów witrifikacyjnych. Najwyższy odsetek, blisko 90% zarodków rozwijających się *in vitro* stwierdzono po witrifikacji w mieszaninie glikolu etylenowego, glikolu i sacharozie.

Witrifikacji poddawane mogą być również zarodki uzyskane metodą zapłodnienia *in vitro* (159,162-164). Szczególnie korzystna jest tutaj mieszanina glicerolu i propandiolu (159), zwłaszcza jeśli jest użyta w połączeniu z wielostopniowym dodawaniem tych związków. Jednakże w badaniach prowadzonych przez Mahmoudzadeha i wsp. (161) nie są potwierdzone przytoczone rezultaty. Autorzy ci wykazali, że już jednonminutowa ekwilibracja morul i wczesnych blastocyst redukuje o 50% szanse ich przeżywania. Dłuższy czas ekwilibracji powoduje dalszą utratę żywotności zarodków, a ekwilibracja czterominutowa doprowadza do całkowitej utraty ich zdolności życiowych.

Inna metoda witrifikacji oparta na mieszaninie glicerolu i glikolu etylenowego, umożliwia przeżywalność zarodków *in vitro* w granicach 80% pod warunkiem, że czas ekwilibracji nie przekracza 2 minut (163), po tym czasie



zaznacza się już toksyczne działanie glikolu etylenowego. Ta stosunkowo wysoka przeżywalność *in vitro* zarodków wityfikowanych w mieszaninie glicerolu i glikolu etylenowego została potwierdzona uzyskaniem ciąży (163).

Z obserwacji własnych oraz innych autorów (165-168) nad wityfikacją zarodków bydłych wyprodukowanych *in vitro* wynika, że ich podatność na kriokonserwację tą metodą jest obniżona w porównaniu do zarodków wyprodukowanych *in vivo*. Wydaje się, że o przeżywalności kriokonserwowanych zarodków uzyskanych *in vitro*, jak już wcześniej wspomniano, w większym stopniu decydują metody hodowli niż kriokonserwacji.

W przedstawionym przeglądzie dotyczącym wityfikacji zarodków bydłych uzyskanych *in vivo* oraz *in vitro* wykazano, że stosunkowo łatwo poddają się one kriokonserwacji poprzez wityfikację. Nie należy jednak zapominać, że w większości przytaczanych doświadczeń przeżywalność wityfikowanych zarodków była oceniana na podstawie rozwoju *in vitro*, a liczba użytych do doświadczeń zarodków była na ogół mała. W naszym przekonaniu rzeczywiste wyniki metod wityfikacji zarodków są niższe. Mimo przytaczanych przez wielu autorów dobrych rezultatów przeżywania metoda ta nie nadaje się jeszcze do praktycznego stosowania.

### 7.2.2. Oocyty

Stosunkowo niewiele doświadczeń dotyczących wityfikacji oocytów bydłych przeprowadzono zarówno na oocytach niedojrzałych (GV) jak również na oocytach dojrzałych (meta II). Próby wityfikacji oocytów w stadium GV nie dały pozytywnych wyników (169,170), natomiast znaczny postęp uzyskano w wityfikacji oocytów w stadium metafazy II. Czynnikiem decydującym o przeżywaniu wityfikowanych oocytów, jak się wydaje, jest skład mieszaniny osłaniającej (171,172). W doświadczeniach nad wityfikacją oocytów w glikolu etylenowym, czy też w mieszaninie glicerolu i propandiolu, nie uzyskano przeżywalności *in vitro* (169) lub przeżywało tylko niewiele oocytów (170). Jednocześnie, wityfikacja w mieszaninie opartej na DMSO i glikolu etylenowym lub DMSO, glikolu polietylenowym i acetamidzie doprowadziła do uzyskania po rozmrożeniu dość wysokiego odsetka (blisko 90%) morfologicznie normalnych oocytów (172). Odznaczały się one dość dobrą zdolnością do zapłodnienia, a uzyskane po IVF blastocysty były zdolne do pełnego rozwoju *in vivo* (171,172). Innym czynnikiem prawdopodobnie decydującym o przeżywalności wityfikowanych oocytów bydłych w stadium metafazy II jest potrzeba wielostopniowego (np. 12-stopniowego) usuwania związków osłaniających podczas rozmrażania (171).

Uzyskane w przedstawionych pracach wyniki dowodzą, że istnieje możliwość efektywnej wityfikacji dojrzałych oocytów bydłych.



## Literatura

1. Smorąg Z., Gajda B., (1995), *Biotechnologia*, 3, 30, 68.
2. Whittingham D. G., Leibo S. P., Mazur P., (1972), *Science*, 178, 411.
3. Wilmut I., (1972), *Science*, 11, 1071.
4. Smorąg Z., Wierzbowski S., Kańska L., (1981), in: *Frozen Storage of Laboratory Animals*, Ed. G. H. Zeilmarker, Gustav Fischer, Stuttgart-New York, 83-88.
5. Kasai M., Niwa K., Iritani A., (1980), *J. Reprod. Fert.*, 59, 51.
6. Merry P. A., Allen R. I., Krog K., Wright R. W. Jr., (1983), *Theriogenology*, 20, 325.
7. Leibo S. P., (1983), *Cryo-Lett.*, 4, 387.
8. Whittingham D. G., Lyon M. F., Glenister P. H., (1977), *Genet. Res.*, 29, 2, 171.
9. Schroeder A. C., Champlin A. K., Mobraaten L. E., Eppig J. J., (1990), *J. Reprod. Fert.*, 89, 45.
10. Carrol J., Whittingham D. G., Wood M. J., Telfer E., Gosden R. G., (1990), *J. Reprod. Fert.*, 90, 321.
11. Rall W. F., Fahy G. M., (1985), *Nature*, 313, 573.
12. Scheffen B., van der Zwalmen P., Massip A., (1986), *Cryo-Lett.*, 7, 260.
13. Bielański A., (1987), *Cryo-Lett.*, 8, 294.
14. Valdez C. A., Abas Mazni O., Takahashi Y., Hishinuma M., Kanagawa H., (1990), *Theriogenology*, 33, 627.
15. Valdez C. A., Hishinuma M., Takahashi Y., Kanagawa H., (1991), *J. Vet. Res.*, 39, 23.
16. Ishimori H., Takahashi Y., Kanagawa H., (1992), *Theriogenology*, 38, 1175.
17. Kasai M., Komi J. H., Takakamo A., Tsudera H., Sakurai T., Machida T., (1990), *J. Reprod. Fert.*, 89, 91.
18. Kasai M., Nishimori M., Zhu S. E., Sakurai T., Machida T., (1992), *Biol. Reprod.*, 47, 1134.
19. Zhu S. E., Kasai M., Otoge H., Sakurai T., Machida T., (1993), *J. Reprod. Fert.*, 98, 139.
20. Rall W. F., Wood M. J., Kirby C., Whittingham D. G., (1987), *J. Reprod. Fert.*, 80, 499.
21. Kono T., Tsunoda Y., (1988), *Cryobiology*, 25, 197.
22. Miyake T., Kasai M., Zhu S. E., Sakumi T., Machida T., (1993), *Theriogenology*, 40, 121.
23. Shaw P. W., Bernard A. G., Fuller B. J., Shaw R. W., (1990), *Cryo-Lett.*, 11, 427.
24. Shaw P. W., Fuller B. J., Bernard A., Shaw R. W., (1991), *Mol. Reprod. Dev.*, 29, 373.
25. Kono T., Kwon O. Y., Nakahara T., (1991), *Cryobiology*, 28, 50.
26. Nakagata N., (1989), *J. Reprod. Fert.*, 87, 479.
27. Maurer R. R., Haseman J. K., (1976), *Biol. Reprod.*, 14, 256.
28. Ogawa S., Tomoda S., (1977), *Fertil. Steril.*, 28, 313.
29. Whittingham D. G., Adams C. E., (1976), *J. Reprod. Fert.*, 47, 269.
30. Landa V., (1982), *Folia Biologica*, 28, 67.
31. Minami N., Hosoi Y., Kasai M., Niwa K., Iritani A., (1984), *Jpn J. Anim. Reprod.*, 30, 1.
32. Renard J. P., Bui-Xuan-Nguen, Garnier V., (1986), *J. Reprod. Fert.*, 7, 260.
33. Smorąg Z., Garnier V., Renard J. P., (1984), *Proc. 10<sup>th</sup> Meeting of the Society for Low Temperature Biology*, Lyon, 9.
34. Tsunoda Y., Soma T., (1981), *Japan J. Anim. Reprod.*, 27, 3.
35. Techakumphu M., Wintenberger-Torres S., Sevellec C., Ménézo Y., (1987), *Anim. Reprod. Sci.*, 13, 221.
36. Al-Hasani S., Kirsch J., Diedrich K., Blanke S., van der Ven H., Krebs D., (1989), *Hum. Reprod.*, 4, 77.
37. Vincent C., Garnier V., Heyman Y., Renard J. P., (1989), *J. Reprod. Fert.*, 87, 809.
38. Kasai M., Hamaguchi Y., Zhu S. E., Miyake T., Sakurai T., Machida T., (1992), *Biol. Reprod.*, 46, 1042.
39. Kobayashi K., Nagashima H., Yamakawa H., Kato Y., Ogawa S., (1990), *Theriogenology*, 33, 4, 777.



40. Papis K., Fujikawa S., Kojima T., Oguri N., (1993), *Cryobiology*, 30, 98.
41. Smorąg Z., Gajda B., Wieczorek B., Jura J., (1989), *Theriogenology*, 31, 1227.
42. Smorąg Z., Gajda B., (1991), *Anim. Reprod. Sci.*, 26, 151.
43. Gajda B., Smorąg Z., (1993), *Theriogenology*, 39, 499.
44. Gajda B., (1996), *Cryo-Lett.*, 17, 363.
45. Willadsen S. M., Polge C., Rowson L. E. A., Moor R. M., (1976), *J. Reprod. Fertil.*, 46, 151.
46. Smorąg Z., Wierzbowski S., Wierzchoś E., Kareta W., Gajda B., (1977), *Medycyna Wet.*, 39, 552.
47. Smorąg Z., Wierzbowski S., Wierzchoś E., Laszczka A., Gajda B., (1982), *Arch. Exper. Vet. Med.*, 36, 1, 163.
48. Smorąg Z., Wierzbowski S., Wierzchoś E., (1978), *Bull. L'Acad. Pol. Sci.*, 2, 26, 273.
49. Tervit H. R., Goold P. G., (1984), *Theriogenology*, 21, 268.
50. Averill R. L. W., Rowson L. E. A., (1959), *J. Agric. Sci.*, 52, 392.
51. Członkowska M., Papis K., Guskiewicz A., Kossakowski M., Eysymont U., (1991), *Cryo-Lett.*, 12, 11.
52. Heyman Y., Vincent C., Garnier V., Cognie Y., (1987), *Vet. Rec.*, 120, 83.
53. McGinnis L. K., Duplantis S. C., Youngs C. R. Jr., (1993), *Anim. Reprod. Sci.*, 30, 273.
54. Merry D. A., Bondioli K. R., Allen R. L., Wright R. W. Jr., (1984), *Theriogenology*, 22, 433.
55. Ware C. B., Boland M. P., (1987), *Theriogenology*, 27, 721.
56. Fahning M. L., Garcia M. A., (1992), *Cryobiology*, 29, 1.
57. Schiewe M. C., Rall W. F., Stuart L. D., Wildt D. E., (1991), *Theriogenology*, 36, 279.
58. de Paz P., Sanchez A. J., Fernandez J. G., Carbajo M., Dominguez J. C., Chamorro C. A., Anel L., (1994), 42, 327.
59. Bilton R. J., Moore N. W., (1976), *Aust. J. Biol. Sci.*, 29, 125.
60. Moor N. W., Bilton R. J., (1976), *Proc. 8<sup>th</sup> Inter. Congr. Anim. Reprod. AI*, Kraków, 3, 306.
61. Rao V. H., Samah B. C., Agrawal K. P., Ansari M. R., Bhattacharyya N. K., (1988), *Anim. Reprod. Sci.*, 16, 261.
62. Li R., Cameron W. N., Balt P. A., Trounson A. O., (1990), *Reprod. Fertil. Dev.*, 2, 345.
63. Le Gal F., Baril G., Vallet J. C., Leboeuf B., (1993), *Theriogenology*, 40, 771.
64. Gajda B., Smorąg Z., Wierzbowski S., Jura J., Wieczorek B., (1989), *Zuchthygiene*, 24, 97.
65. Massip A., van der Zwalmen P., Scheffen B., Ectors F., (1986), *Cryo-Lett.*, 7, 270.
66. Ali J., Shelton J. N., (1993), *J. Reprod. Fertil.*, 99, 65.
67. de Paz P., Sanchez A. J., Fernandez J. G., Carbajo M., Dominguez J. C., Chamorro C. A., Anel L., (1994), *Theriogenology*, 42, 327.
68. Széll A. Z., Windsor D. P., (1994), 42, 881.
69. Schiewe M. C., Rall W. F., Stuart L. D., Wildt D. E., (1991), *Theriogenology*, 36, 279.
70. Naitana S., Dattena M., Gallus M., Loi P., Branca A., Ledda S., Cappai P., (1995), *Theriogenology*, 43, 1371.
71. Yuswiati E., Holtz W., (1990), *Theriogenology*, 34, 4, 629.
72. Wilmut I., (1972), *J. Reprod. Fertil.*, 31, 513.
73. Polge C., Wilmut I., Rowson L. E. A., (1974), *Cryobiology*, 11, 560.
74. Nagashima H., Kato Y., Shibata K., Ogawa S., (1987), *Theriogenology*, 27, 262.
75. Nagashima H., Kato Y., Yamakawa H., Ogawa S., (1988), *Jpn. J. Anim. Reprod.*, 34, 2, 123.
76. Nagashima H., Kato Y., Yamakawa H., Matsumoto T., Ogawa S., (1989), *Jpn. J. Anim. Reprod.*, 35, 130.
77. Niemann H., (1985), *Theriogenology*, 23, 213 (abstr.).
78. Polge C., Willadsen S. M., (1978), *Cryobiology*, 15, 370.
79. Toner M., Cravalho E. G., Ebert K. M., Overström E. W., (1986), *Biol. Reprod.*, 34, suppl., 98 (abstr.).



80. Nagashima H., Kashiwazaki N., Ashman R., Grupen C., Seamark R. F., Nottle M., (1994), *Theriogenology*, 41, 113.
81. Hayashi S., Kabayashi K., Mizuno J., Saitoh K., Hirano S., (1989), *Vet. Rec.*, 125, 43.
82. Kashiwazaki N., Ohtani S., Miyamoto K., Ogawa S., (1991), *Vet. Rec.*, 16, 256.
83. French A. J., Cecil A., Seamark R. F., (1991), *Proc. The 23<sup>rd</sup> Ann. Conf. Austr. Soc. Reprod. Biol.*, Sydney, Australia, 119 (abstr.).
84. Nagashima H., Yamakawa H., Niemann H., (1992), *Theriogenology*, 37, 839.
85. Cameron R. D. A., Lising R. T., Nagashima H., Blackshaw A. W., (1992), *Proc. 12<sup>th</sup> Intern. Pig Vet. Soc.*, Hague, The Netherlands, 476, (abstr.).
86. Fujino Y., Ujisato Y., Endo K., Tomizuka T., Kojima T., Oguri N., (1993), 30, 299.
87. Arav A., Bacci M. L., (1989), *Cryobiology*, 26, 6, 543.
88. Didion B. A., Pomp D., Martin M. J., Homanics G. E., Market C. L., (1990), *J. Anim. Sci.*, 68, 2803.
89. Rubinsky B., Arav A., de Vries A. L., (1991), *Cryo-Lett.*, 12, 93.
90. Arav A., Rubinsky B., Fletcher G., Seren E., (1993), *Mol. Reprod. Dev.*, 36, 488.
91. de Vries A. L., (1988), *Comp. Biochem. Physiol.*, 90B, 3, 611.
92. Rubinsky B., Arav A., de Vries A. L., (1992), *Cryobiology*, 29, 69.
93. Lee C. Y., Rubinsky B., Fletcher G. L., (1992), *Cryo-Lett.*, 13, 59.
94. Yoshimo J., Kojima T., Shimizu M., Tomizuka T., (1993), *Cryobiology*, 30, 413.
95. Kuwayama M., Holm P., Jacobsen H., Greve T., Callesen H., (1997), *Vet. Rec.*, 4, 365.
96. Nagashima H., Kuwayama M., Grupen C. G., Ashman R. J., Nottle M. B., (1996), *Theriogenology*, 45, 180.
97. Arav A., Rubinsky B., Bacci M. L., (1990), *Cryobiology*, 27, 628.
98. Tischner M., Gonzales-Mijares, (1983), *Med. Wet.*, 1, 42.
99. Fulka J., Okólski A., (1981), *J. Reprod. Fertil.*, 61, 213.
100. Wilson J. M., (1986), Ph. D. Thesis. Texas, A & M. University , 150.
101. Wilson J. M., Caceci T., Potter G. D., Kraemer D. C., (1987), *J. Reprod. Fert., Suppl.*, 35, 405.
102. Yamamoto Y., Oguri N., Tsutsumi Y., Hachinohe Y., (1982), *J. Reprod. Fert., Suppl.*, 32, 399.
103. Willadsen S. M., (1980), *Proc. 9<sup>th</sup> Int. Congr. Anim. Reprod. A.I.*, Madryt, 255.
104. Boyle M. S., Allen W. R., Tischner M., Członkowska M., (1985), *Equine Vet. J., Suppl.*, 3, 36.
105. Takeda T., Elsdén R. P., Squires E. L., (1984), *Proc. 10<sup>th</sup> Int. Congr. Anim. Reprod., A.I.*, 2, 246.
106. Członkowska M., Boyle M. S., Allen W. R., (1985), *J. Reprod. Fert.*, 75, 485.
107. Seidel Jr G. E., Squires E. L., McKinnon A. O., Long P. L., (1989), *Equine Vet. J.*, 8, Suppl., 87.
108. Pfaff R., Seidel Jr. G. E., Squires E. L., Jasko D. L., (1993), *Theriogenology*, 39, 284, (abstr.).
109. Slade N. P., Takeda T., Squires E. L., Elsdén R. P., Seidel Jr. G. E., (1985), *Theriogenology*, 24, 45.
110. Hohi S., Fujimoto T., Choi Y. H., Braun J., Oguri N., (1994), *Theriogenology*, 42, 1085.
111. Hohi S., Fujimoto T., Braun J., Oguri N., (1994), *Theriogenology*, 42, 483.
112. Wilmut I., Rowson L. E. A., (1973), *Vet. Rec.*, 92, 686.
113. Bilton R. J., Moore N. W., (1979), *Austr. J. Biol. Sci.*, 32, 101.
114. Franks G. C., Coley S. L., Betterbed B., Page R. D., (1985), *Theriogenology*, 23, 194.
115. Lehn-Jensen H., Greve T., (1980), *Theriogenology*, 13, 100.
116. Lehn-Jensen H., (1980), *Proc. 9<sup>th</sup> Int. Congr. Anim. Reprod. A.I.*, Madryt, 3, 461.
117. Boysson B., Chupin D., (1982), *Theriogenology*, 17, 80.
118. Lehn-Jensen H., Greve T., (1979), *Arsberet. K. Vet. Landbohøjsk. Inst. Sterilitets. Forsk.*, 22, 47.



119. Richards D. W., Sikes J. D., Murphy C. N., (1988), *Theriogenology*, 29, 295.
120. Poll S. H., Rorie R. W., Casey P. L., Godke R. A., (1988), *Theriogenology*, 29, 287.
121. Kennedy L. G., Boland M. P., Gordon I., (1983), *Theriogenology*, 19, 823.
122. Niemann V. H., Sacher V., Schilling E., Smidt D., (1982), *Berl. Muench. Tieraerztl. Wochenschr.*, 95, 415.
123. Chupin D., Procureur R., (1984), *Theriogenology*, 21, 230.
124. Franks G. C., Coley S. L., Betterbed B., Page R. D., (1986), *Theriogenology*, 26, 135.
125. Renard J.-P., Heyman Y., Leymonie P., Plat J.-C., (1983), *Theriogenology*, 19, 145.
126. Lehn-Jensen H., (1984), *Proc. 10<sup>th</sup> Int. Congr. Anim. Reprod. and A.I.*, Urbana, 5.
127. Smorag Z., Kańska L., Wierzbowski S., (1976), *Proc. 8<sup>th</sup> Int. Congr. Anim. Reprod. and A.I.*, 3, 319.
128. Whittingham D. G., (1977), in: *The Freezing of Mammalian Embryos*, Eds. Elliot K., Whelan J., Ciba Foundation Symposium 52, Elsevier, Amsterdam, 97.
129. Zhenyan S., Yiqun H., Hexing H., Zhonghua J., Youlang K., Jinhai F., Wenming S., Kuixing L., (1983), *Acta Vet. Zootech. Sin.*, 14, 241.
130. Cacheiro A., Balerna M., Ansary E. L., Latif A., Hafez E. S. E., (1986), *Theriogenology*, 19, 116.
131. Takeda T., (1987), *Theriogenology*, 27, 284.
132. Rall W. F., Meyer T. K., (1989), *Theriogenology*, 31, 683.
133. Renard H., Heyman J.-P., Ozil J.-P., (1982), *Ann. Med. Vet.*, 126, 23.
134. Leibo S. P., (1982), *Proc. Int. Congr. Embryo Transfer Mammals*, Annency, France, 97.
135. Leibo S. P., (1985), *Theriogenology*, 23, 201.
136. Bielański A., Schneider U., Pawlyshyn V. P., Mapletoft R. J., (1986), *Theriogenology*, 25, 429.
137. Takeda T., Elsdon R. P., Seidel G. E. Jr., (1985), *Theriogenology*, 23, 232.
138. Prather R. S., Spire M. F., Schalles R. R., (1987), *Theriogenology*, 28, 195.
139. Seok H. B., Lee K. W., Oh S. Y., Son D. S., Yun C. K., Kim H. J., Cho Y. Y., Oh D. K., Chee S. H., Im K. S., Mahon G. D., (1984), *Korean J. Anim. Sci.*, 26, 429.
140. Ware C. B., Boland M. P., (1987), *Theriogenology*, 27, 721.
141. Leibo S. P., (1988), *Proc. 11<sup>th</sup> Inter. Congr. Anim. Reprod. and A.I.*, Dublin, Ireland, 5, 370.
142. Niemann H., Brem G., Sacher B., Smidt D., Kräusslich H., (1986), *Theriogenology*, 25, 519.
143. Leibo S. P., Loskutoff N. M., (1993), *Theriogenology*, 39, 81.
144. Pollard J. W., Leibo S. P., (1993), *Theriogenology*, 39, 287.
145. Loskutoff N. M., Greve T., Betteridge K. J., Leibo S. P., (1993), *Theriogenology*, 39, 263.
146. Schelländer K., Brackett B. G., Führer F., Schleger W., (1988), in: *In vitro fertilization of frozen-thawed cattle oocytes*, in: *Proc. 11<sup>th</sup> Inter. Conf. Anim. Reprod. and A.I.*, Dublin, Ireland, 3, 349.
147. Lim J. M., Fukui Y., Ono H., (1991), *Theriogenology*, 35, 1225.
148. Glass K. W., Voelkel S. A., (1990), *Biol. Reprod.*, 42, (suppl.1), 52.
149. Herrler A., Rath D., Niemann H., (1991), *Theriogenology*, 33, 212 (abstr.).
150. Otoi T., Tachikawa S., Kondo S., Suzuki T., (1992), *Theriogenology*, 38, 711.
151. Suzuki T., Nishikata Y., (1992), *Theriogenology*, 37, 306 (abstr.).
152. Suzuki T., Boediono A., Takagai M., Saha S., Sumantri C., (1996), *Cryobiology*, 33, 515.
153. Massip A., van der Zwalmen P., Schefen B., Ectors F., (1986), *Cryo-Lett.*, 7, 270.
154. Lopez-Gatius F., Camon-Urgel J., (1989), *Zuchthygiene*, 24, 255.
155. Smorag Z., Gajda B., (1994), *Applied Biology Communication*, 4, 27.
156. van der Zwalmen P., Touati K., Ectors F. J., Massip A., Beckers J. F., Ectors F., (1989), *Theriogenology*, 31, 270.
157. Fahy G. M., MacFarlane D. R., Angell C. A., Meryman H. T., (1984), *Cryobiology*, 21, 407.
158. Rall W. F., Fahy G. M., (1985), *Nature*, 313, 573.



159. Kuwayama M., Hamano S., Nagai T., (1992), *J. Reprod. Fert.*, 96, 187.
160. Riha J., Landa V., Kneissl J., Matus J., Jindra J., Kloucek Z., (1991), *Živoc. Vyr.*, 36, 113.
161. Mahmoudzadeh A. R., van Soom A., van Vlaenderen I., de Kruif A., (1993), *Theriogenology*, 39, 1291.
162. Dobrinsky J. R., Stice S. L., Phillips P. E., DUBY R. T., Robl J. M., (1992), *Theriogenology*, 37, 1, 202.
163. Tachikawa S., Otoi T., Kondo S., Machida T., Kasai M., (1993), *Mol. Reprod. Dev.*, 34, 266.
164. Yang N. S., Lu K. H., Gordon I., Polge C., (1992), *Theriogenology*, 38, 326.
165. Gajda B., Kańska L., (1996), *Proc. 5<sup>th</sup> Int. Conf. on Tissue Banking*, Berlin, 35.
166. Gajda B., Kańska L., Smorąg Z., (1996), *J. Phys. and Pharm.*, 47, 2, 149 (abstr.)
167. Gajda B., Kańska L., Smorąg Z., (1997), *Infusionstherapie and Transfusionsmedizin*, 24, 5, 70 (abstr.).
168. Leibo S. P., Loskutoff N. M., (1993), *Theriogenology*, 39, 81.
169. Avery B., Schmidt M., Greve T., (1992), *Proc. 12<sup>th</sup> Int. Congr. Anim. Reprod.*, The Hague, 3, 1421.
170. Watanabe Y. F., Oliveira Filho E. B., (1992), *Proc. 12<sup>th</sup> Int. Congr. Anim. Reprod.*, The Hague, 3, 1421.
171. Hamano S., Koikeda A., Kuwayama M., Nagai T., (1992), *Theriogenology*, 38, 1085.
172. Hamano S., Kuwayama M., (1992), *Proc. 12<sup>th</sup> Int. Congr. Anim. Reprod.*, The Hague, 3, 1421.

## Cryoconservation of mammalian embryos and oocytes

### Summary

This paper presents current methods of embryo and oocyte cryoconservation in the following species: mice, rabbits, sheep and goats, pigs, horses and cows. Both the freezing and vitrification methods are discussed with special emphasis on the major factors affecting the efficiency of these two methods.

### Key words:

cryoconservation, freezing, vitrification, embryo, oocyte, mammals.

### Adres do korespondencji:

Barbara Gajda, Zakład Fizjologii Rozrodu Zwierząt, Instytut Zootechniki,  
32-083 Balice k. Krakowa.