

Witryfikacja oocytów i zarodków ssaków

Zdzisław Smorąg

Barbara Gajda

Zakład Fizjologii Rozrodu Zwierząt

Instytut Zootechniki

Balice k. Krakowa

1. Wstęp

W rezultacie konserwacji oocytów i zarodków w niskich temperaturach dochodzi do zatrzymania wszystkich biologicznych procesów. Stwarza to atrakcyjną możliwość kontroli rozrodu zwierząt. Około 1/3 zarodków uzyskiwanych w USA i w Europie poddawanych jest obecnie kriokonserwacji (41). Metoda jest dość powszechnie stosowana w praktyce przenoszenia zarodków u bydła.

Od czasu uzyskania normalnego potomstwa u myszy po przeniesieniu mrożonych zarodków (58,59), podobny rezultat zanotowano u 13 innych gatunków ssaków. W tym czasie opracowano też wiele modyfikacji konwencjonalnej metody wolnego mrożenia zarodków ssaków (29).

Witryfikacja jest nową metodą kriokonserwacji oocytów i zarodków. W metodzie tej zestalenie płynu odbywa się nie na drodze krystalizacji, ale poprzez bardzo szybki wzrost lepkości w trakcie schładzania (7). Ograniczeniem metody nie są problemy wynikające z warunków hipersomatycznych czy też tworzenia się wewnątrzkomórkowego lodu. Głównym problemem witryfikacji jest toksyczność związków osłaniających oraz uszkodzenia natury osmotycznej. Są one powodowane wysoką koncentracją związków osłaniających oraz czasem ekspozycji konserwowanego materiału biologicznego (29). Zjawiska te mogą być kontrolowane dzięki użyciu odpowiednich mieszanin związków osłaniających. Roztwory o wysokiej koncentracji związków osłaniających w PBS nie podlegają krystalizacji w trakcie schładzania do niskich temperatur, lecz zamiast tego stają się coraz bardziej lepkie i zestalają się w formie zeszlonej (29). Zastosowanie witryfikacji do kriokonserwacji oocytów i zarodków różnych gatunków ssaków zależeć będzie od opracowania odpowiednich metod postępowania i nie toksycznych mediów (29). Koncentracja związków osłaniających niezbędna dla uzyskania witryfikacji jest stosunkowo wysoka i dlatego nie

jest tolerowana przez większość systemów biologicznych (7). Istnieją dwie metody redukcji toksycznego działania związków osłaniających: metoda bezpośrednia oraz pośrednia (4,5,7,29,31,32,36,38,39,41,43,51).

Z technicznego punktu widzenia witryfikacja jest metodą prostą i łatwą do zastosowania w warunkach praktycznych. W artykule tym przedstawiamy aktualny przegląd możliwości witryfikacji oocytów i zarodków zarówno zwierząt laboratoryjnych jak i gospodarskich.

2. Mysz i szczur

2.1. Oocyty (tab.1)

Oocyty mysie, przeciwnie niż oocyty innych gatunków ssaków, są podatne na witryfikację w stopniu porównywalnym do zarodków. Stosując procedurę witryfikacji opracowaną przez Ralla i Fahy (37) można uzyskać po witryfikacji od około 50 (46,47) do 80-90% (33,34) oocytów morfologicznie normalnych. Podobnie, wyniki przenoszenia zarodków uzyskanych w wyniku zapłodnienia kriokonserwowanych oocytów są również zadowalające, gdyż wynoszą około 50% (20,34).

Wysoka efektywność witryfikacji oocytów w mieszaninie zaproponowanej przez Ralla i Fahy (37) kontrastuje z niską przeżywalnością oocytów w stadium metafazy II witryfikowanych w roztworach opartych na glikolu etylenowym i fikolu. W tym ostatnim przypadku uzyskuje się jedynie kilkuprocentową przeżywalność, pomimo że przeżywalność niedojrzałych oocytów (GV) jest stosunkowo wysoka, bo wynosi około 40% (33). Podsumowując można stwierdzić, że obecne metody witryfikacji pozwalają na uzyskanie zadowalających wyników kriokonserwacji zarówno niedojrzałych jak i dojrzałych mysich oocytów.

2.2. Zarodek (tab.1)

Metoda witryfikacji została po raz pierwszy zastosowana do kriokonserwacji zarodków myszy przez Ralla i Fahy w 1985 r. (37). Autorzy poddawali witryfikacji zarodki mysie w stadium 8-blastomerów, stosując mieszaninę związków osłaniających penetrujących i niepenetrujących (VS1), zawierającą DMSO (20,5%), acetamid (15,5%), glikol propylenowy (10%) i glikol polietylenowy (6%). Postępowanie polegało na trójstopniowej ekspozycji zarodków w mieszaninie VS1 o temp. 4°C, najpierw we wzrastających koncentracjach od 25 do 50% VS1 w PBS, następnie przełożeniu zarodków do mieszaniny witryfikacyjnej zawierającej 75, 85, 90 lub 100% VS1 w PBS. Po 10 minutach następowało schładzanie mieszaniny metodą szybką (2500°C/min) lub wolną (ok. 20°C/min) do temperatury ciekłego azotu. Najwyższy odsetek zarodków rozwijających się *in vitro* (od 80 do 87%) stwierdzono w przypadku użycia

TABELA 1
WITRYFIKACJA OOCYTÓW I ZARODKÓW MYSZY I SZCZURA. METODY I WYNIKI

Rodzaj witryfikowanego materiału	Metody	Wyniki	Autorzy
Oocyty			
	MW: 2,53M DMSO + 2,36MAC + 1,36M PG + 5,4% (w/v) PEG. DM: PB1 + 0,3M S	<i>in vitro</i> : po IVF-zygoty 81,6%, zarodki 2b-78,4%; <i>in vivo</i> : 45,8% młodych po transpl. zarodków 2b	Nakagata, 1989 (34)
	witryfikacji: Rall i Fahy, 1985	<i>in vitro</i> : kontrola — 97%; po witryfikacji — 48%; po ekspozycji — 49%	Shaw i współ., 1990 (46)
	witryfikacji: Rall i Fahy, 1985	<i>in vitro</i> : kontrola — 87,5%; po witryfikacji — 55,4%; po ekspozycji — 72,4%	Shaw i współ., 1991 (47)
	MW: 20,5% (w/v) DMSO + 15,5% (w/v) Ac + 10% (w/v) PG + 6% (w/v) PEG	<i>in vitro</i> : zapłodnionych — od 84 do 94%; blastocyst po IVF — od 69 do 78%; <i>in vivo</i> : urodzonych młodych — 51%	Kono i współ., 1991 (20)
	MW: 40% (w/v) EG + 18% (w/v) F + 0,3M S (EFS)	<i>in vitro</i> : oocyty witryfikowane z komórkami cumulus — od 36 do 39%; bez komórek cumulus — od 2 do 4%	Miyake i współ., 1993 (33)
Zygoty	MW: DMSO + Ac + PG + PEG. DM: GLY + S	<i>in vitro</i> : od 9 do 79% (jądra witryfikowane lub świeże + cytoplazma witryfikowana lub świeża); <i>in vivo</i> : od 30 do 40% (jądra witryfikowane lub świeże + cytoplazma witryfikowana lub świeża)	Kono i Tsunoda, 1988 (18)
Zarodki 8-blastomerowe	MW: VS1 — 20,5% (w/v) DMSO + 15,5% (w/v) Ac + 10% (w/v) PG + 6% (w/v) PEG	<i>in vitro</i> : od 80 do 87%	Rall i Fahy, 1985 (37)
morula, blastocysta	EM: 10% GLY + 20% PROH; VM: 25% GLY + 25% PROH; DM: 1M S	<i>in vitro</i> : morule — 80%, blastocysty — 40%; <i>in vivo</i> : 30,7%	Scheffen i współ., 1986 (45)
morula, blastocysta bez zona pellucida (ZPf) oraz z zona pellucida (ZPi)	witryfikacji: Scheffen i współ., 1986	<i>in vitro</i> : morule ZPi — 75%, blastocysty ZPi — 46%, morule ZPf — 48%, blastocysty ZPf — 27%	Bielaniński, 1987 (2)

8-blastomerowe	MW: 90% VS1, VS1 (Rall i Fahy, 1985)	<i>in vitro</i> : 80%; <i>in vivo</i> : 17%	Rall i wspóln., 1987 (40)
morule	MW: 40% EG + 30% F + 0.5M S (EFS)	<i>in vitro</i> : od 97 do 98%; <i>in vivo</i> : 51%	Kasai i wspóln., 1990 (14)
8-blastomerowe, morule, blastocysty	MW: 25% GLY +25% PROH. E: różny czas, różne temperatury	<i>in vitro</i> : 8b — od 73 do 77%, morule — od 88 do 90%, blastocysty — od 36 do 71%; <i>in vivo</i> : 8b — od 50 do 73%, morule — od 76 do 91%, blastocysty — od 40 do 43%	Valdez i wspóln., 1990 (54)
morule	witryfikacji: Scheffen i wspóln., 1986	<i>in vitro</i> : od 76 do 92%	Valdez i wspóln., 1991 (55)
blastocysty	4 koncentracje 6 penetrujących związków osłaniających (GLY, EG, PG, DMSO, 1,2-BTL, 2,3-BTL). E: dwustopniowe	<i>in vitro</i> : optymalny wariant (29% E-GLY, 20% DMSO, 10% BTL) — od 95 do 96%; <i>in vivo</i> : od 45 do 54%	Valdez i wspóln., 1992 (56)
morule	MW: 40% EG + 18% F + 0.3M S (EFS)	<i>in vitro</i> : od 94 do 100%	Kasai i wspóln., 1992 (16)
morule, blastocysty	sześć rodzajów mieszanin witryfikacyjnych: GLY + EG, GLY + PG, GLY + DMSO, EG + DMSO, PG + DMSO (koncentracja każdego związku osłaniającego: 2.5% (w/v))	<i>in vitro</i> : od 91 do 98%; <i>in vivo</i> : od 38 do 42%	Ishimori i wspóln., 1992 (12)
blastocysty	MW: 25% EG + 25% DMSO	<i>in vitro</i> : od 91 do 98%; <i>in vivo</i> : od 38 do 42%	Ishimori i wspóln., 1992 (13)
blastocysta ekspandująca	-MW: EFS 20, EFS30 i EFS 40 (20, 30 lub 40% EG + 30% FG + 0.5M S). E: jedno- lub dwustopniowa; temp. 10, 20, 25 °C, różne czasy	<i>in vitro</i> : D — 1-stopniowe 66%, D — 2-stopniowe w 20°C — od 83 do 84%, 2-stopniowe w 25°C — od 94%; <i>in vivo</i> urodzone młode po zastosowaniu metody 2-stopniowej	Zhu i wspóln., 1993 (64)
Zarodki uzyskane <i>in vitro</i> . Stadium 1b do blastocysty	MW: EFS	<i>in vitro</i> : zarodki 1b — 62%, 2b — 77%, 4b — 80%, 8b i morule — wczesne blastocysty — od 90 do 95%, blastocysty — 79%, ekspandujące blastocysty — 57%; <i>in vivo</i> : zarodki 2,4 i 8b — od 43 do 57% ciąży	Miyake i wspóln., 1993 (33)
Zarodki szczura , blastocysty	MW: VS1 (Rall i Fahy, 1985)	<i>in vitro</i> : 79%; <i>in vivo</i> : 41%	Kono i wspóln., 1988 (19)

mieszaniny witrifikacyjnej o koncentracji 90 i 100% VS1, zarówno podczas szybkiego jak i wolnego schładzania. Wysoka skuteczność opisanej procedury witrifikacji została potwierdzona w późniejszych doświadczeniach Ralla i współ. (40) nad witrifikacją 8-blastomerowych zarodków myszy.

Znacznie mniej skomplikowaną mieszaninę witrifikacyjną oraz procedurę postępowania zastosowali dla zarodków mysich Scheffen i współ. (45). Autorzy poddawali witrifikacji w mieszaninie glicerolu i 1,2-propandiolu morule i blastocysty uzyskując wysoką przeżywalność *in vitro* wynoszącą dla morul 80, a dla blastocyst 40%. Przeżywalność *in vivo* sięgała do 30%. Przydatność metody Scheffena i współ. (45) dla witrifikacji zarodków mysich została potwierdzona przez Bielańskiego (2) oraz Valdeza i współ. (54,55). Autorzy osiągnęli podobną przeżywalność *in vitro* w przypadku witrifikacji zarodków w stadium moruli. Zastosowana niższa temperatura ekwilibracji przed witrifikacją (4°C zamiast 20°C) umożliwiła uzyskanie wyższej przeżywalności (71,5%) witrifikowanych blastocyst (54).

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 optymalne stadium, z punktu widzenia witrifikacji stanowi morula, gdyż osiągnięta przeżywalność *in vitro* waha się od 75 do 100% (2,12,14,16,45,54,55). Nieco niższe wyniki przeżywalności, bo wynoszące od 70 do 90% (37,39,40,54) uzyskuje się witrifikując zarodki w stadium 8-komórkowym. W przypadku witrifikacji blastocyst stwierdza się znaczne zróżnicowanie wyników przeżywalności *in vitro* wahające się od 40 do 90% (2,12,13,44,54,56,64). Podobne wahania, lecz na niższym poziomie, obserwuje się podczas witrifikacji zygot mysich (18,33). Uzyskiwany wysoki odsetek witrifikowanych zarodków mysich rozwijających się *in vitro* nie odpowiada odsetkowi zarodków rozwijających się *in vivo*. Po transplantacji zarodków mysich przeżywa zazwyczaj od 30 do 50% zarodków (12,13,14,18,33,45,54,56).

Jedynie, jak dotychczas, doniesienie o witrifikacji zarodków szczura wskazuje również na możliwość efektywnej kriokonserwacji zarodków tego gatunku (19). Zastosowana w tych badaniach mieszanina witrifikacyjna opracowana przez Ralla i Fahy (37) pozwoliła na uzyskanie po rozmrożeniu 70% zarodków rozwijających się *in vitro* i 40% *in vivo*.

3. Królik

3.1. Zarodki (tab. 2)

Dotychczas najczęściej stosowanym medium do witrifikacji zarodków królika jest mieszanina glicerolu i 1,2-propandiolu (9,17,35,48,49) oraz mieszanina glikolu etylenowego i fikolu (15). Stwierdzono, że zarodki tego gatunku wykazują również znaczne różnice w podatności na witrifikację w zależności

TABELA 2
WITRYFIKACJA ZARODKÓW KRÓLIČYCH. METODY I WYNIKI

Stadium rozwoju zarodka	Metody	Wyniki	Autorzy
1-blastomerowe, 2-blastomerowe, 8-16-blastomerowe, morula, blastocysta	MW: I — 30% GLY + 30% PROH, II — 35% GLY + 35% PROH, ME: 25% GLY + 25% PROH, DM: 1M S	<i>in vitro</i> : MW I: zarodki 1b — 0%, 2b — 0%, 8-16b — 23%, morule — 82%, blastocysty — 78%, MW II: zarodki 1b — 20%, 2b — 43%, 8-16b — 92%; <i>in vivo</i> : witryfikowane morule — 26,5%, kontrola — 24%	Smorag i współ., 1989 (48)
morula	MW: 25% GLY + 25% PROH	<i>in vitro</i> : całe morule — 86,6%, morule po bisekcji — 80%; <i>in vivo</i> : 18,3%	Kobayashi i współ., 1990 (17)
świeże lub hodowane, 8-16b, morule, blastocysty	MW: 35% GLY + 35% PROH	<i>in vitro</i> : świeże morule — 89,9%, hodowane — 93,8%, hodowane we współhodowli — 91,2%; <i>in vivo</i> : świeże morule — 11,7%, hodowane — 7,1%	Smorag i Gajda, 1991 (49)
morule	MW: 40% EG + 18% F + 0.3M S (EFS)	<i>in vitro</i> : od 79 do 100%; <i>in vivo</i> : 65%	Kasai i współ., 1992 (15)
morule	MW: 10% GLY + 20% PROH + 1M S	<i>in vitro</i> : 89,5%	Papis i współ., 1993 (35)
1-blastomerowe, 2-blastomerowe	MW: I — 35% GLY + 35% PROH, II — 20% GLY + 50% PROH	<i>in vitro</i> : MW I: zarodki 1b — 18,3%, 2b — 13,7%, MW II: 1b — 25,7%, 2b — 35,4%	Gajda i Smorag, 1993 (9)

od osiąganego stadium rozwoju. Witryfikując morule królicze uzyskuje się po rozmrożeniu wysoki bo sięgający od 80 do 100% odsetek zarodków rozwijających się *in vitro* (15,17,35,48,49). Nieco tylko niższe rezultaty przeżywania *in vitro* osiąga się po witryfikacji blastocyst (48,49). Przeżywalność witryfikowanych zarodków w stadium od 1-, do 8-16 blastomerów zależy w dużym stopniu od koncentracji związków osłaniających, będących składnikami mieszaniny witryfikacyjnej (48). 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% (48). Wydaje się, że zjawisko to spowodowane może być zróżnicowaną przepuszczalnością błony cytoplazmatycznej komórek zarodka przez związki osłaniające. Przepuszczalność ta prawdopodobnie zwiększa się wraz z osiąganiem przez zarodek bardziej zaawansowanego stadium rozwoju.

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 (17,48). Możliwość osiągnięcia wyższych wyników przeżywalności *in vivo* (60%) wykazali Kasai i współ. (15) witryfikując zarodki królicze w mieszaninie glikolu etylenowego, fikolu i sacharozy. Stwierdzona została również możliwość witryfikacji połówek zarodków króliczych (17). Przeżywalność takich zarodków nie odbiegała od przeżywalności witryfikowanych zarodków całych.

Podsumowując, można stwierdzić, że zarodki królicze mogą być z powodzeniem kriokonserwowane za pomocą metody witryfikacji, pod warunkiem, że osiągnęły stadium rozwoju 8 blastomerów lub wyższe. Witryfikacja zarodków króliczych znajdujących się we wcześniejszych stadiach rozwoju (1-, 2-blastomerowe) jest nadal problemem nie rozwiązany.

Dotychczas, brak doniesień dotyczących możliwości witryfikacji oocytów króliczych.

4. Owca

4.1. Zarodki (tab. 3)

Pierwsze udane próby witryfikacji zarodków owczych zostały przeprowadzone przez Gajdę i współ. (8). Autorzy witryfikowali morule owcze w mieszaninie 35% glicerolu + 30% 1,2-propandiolu lub 30% glicerolu + 35% 1,2-propandiolu, uzyskując przeżywalność *in vivo* porównywalną z przeżywalnością zarodków zamrażanych metodą wolną. Możliwość pełnego rozwoju *in vivo* witryfikowanych zarodków owczych uwarunkowana była przeniesieniem zarodków do biornic bezpośrednio (do 2 min) po rozmrożeniu i usunięciu środka osłaniającego. Podobne obserwacje dotyczące transplantacji witryfikowanych zarodków natychmiast po rozmrożeniu zanotowali na zarodkach bydłych Masip i współ. (25).

TABELA 3
WITRYFIKACJA ZARODKÓW OWCZYCH. METODY I WYNIKI

Stadium rozwoju zarodka	Metody	Wyniki	Autorzy
morula	MW: I — 35% GLY + 30% PROH, II — 30% GLY + 35% PROH	<i>in vivo</i> : 50% (6/12); I — 60%, II — 43%	Gajda i współ., 1989 (8)
morula — wczesna blastocysta	MW: 25% GLY + 25% PROH	<i>in vitro</i> : późne morule — wczesne blastocysty — 36%, blastocysty — 70%; <i>in vivo</i> : morule — 11%, blastocysty — 32%	Szell i współ., 1990 (52)
morula — wczesna blastocysta	MW: I — 25% GLY + 25% PG, II — 25% EG + 25% PG	<i>in vitro</i> : morule — wczesne blastocysty: I — 0%, II — 0%; blastocysty I — 33%, II — 0%	Mc Ginnis i Youngs, 1990 (30)
morula — blastocysta	MW: 6.5M GLY + 6% BSA (VS3a); E: stopniowa	<i>in vitro</i> : blastocysty ekspandujące — 60%, blastocysty wyległe — 40%; <i>in vivo</i> : 2 jagnięta z 7 transplantowanych zarodków	Schewe i współ., 1991 (44)

Dotychczas do wityfikacji zarodków owczych używano takich związków osłaniających jak: glikol propylenowy (PG), glikol etylenowy (EG), glicerol (GLY) czy propandiol (PROH) (30,52). Wityfikacja morul owczych w EG + PG nie dała pozytywnych rezultatów przeżywania, podczas gdy 33% blastocyst wityfikowanych w GLY + PG przeżywało w hodowli *in vitro* (30). W badaniach przeprowadzonych przez Szella i współ. (52) wykazano, że zarodki owcze wityfikowane w GLY + PROH są bardziej podatne na wityfikację w stadium blastocysty niż moruli. Potwierdzono to w uzyskanych wynikach przeżywalności, które wynosiły *in vitro* 36 i 70%, *in vivo* 11 i 32% odpowiednio dla morul i blastocyst (52).

Zarodki owcze wityfikowano również z powodzeniem w wysoko skoncentrowanym medium VS3 zawierającym 6,5M glicerolu + 6% albuminy surowicy bydlęcej (44). Obecny w medium VS3 glicerol zaliczany do związków trudniej przenikających do komórki jest czynnikiem osłaniającym zarodki przechowywane w niskich temperaturach. Natomiast albumina jako wyokocząsteczkowy polimer ma właściwości stabilizujące błony cytoplazmatyczne, zwłaszcza podczas rozmrażania (44). Uzyskany w tych badaniach odsetek zarodków (60% rozwijających się *in vitro* blastocyst ekspandujących, 40% blastocyst wylęgłych) był porównywalny z wynikami przeżywalności zarodków zamrażanych z zastosowaniem metody jednostopniowej.

We wszystkich doświadczeniach nad wityfikacją zarodków owczych medium wityfikacyjne było usuwane z komórek jednostopniowo za pomocą roztworu sacharozy. Zastosowanie sacharozy podczas rozmrażania zmniejsza ryzyko wystąpienia uszkodzeń spowodowanych szkodliwym oddziaływaniem związku osłaniającego, jak również uszkodzeń natury osmotycznej na skutek zmian koncentracji związku osłaniającego (44). Wykazano, że zmiany degeneracyjne wityfikowanych zarodków są prawdopodobnie w większym stopniu następstwem toksycznego wpływu roztworów niż uszkodzeń osmotycznych czy mechanicznych.

Przedstawione procedury wityfikacji zarodków owczych, 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.

Dotychczas brak doniesień o wityfikacji oocytów owczych.

5. Świnia

5.1. Zarodki

Ostatnio doniesiono o skutecznej wityfikacji zarodków świńskich w stadium rozwoju od ekspandującej do wylęgłej blastocysty (63). Autorzy zastosowali 4 mieszaniny wityfikacyjne: EFT — mieszanina 7,2M glikolu etylenowego + 0,003M fikolu + 0,3M trehalozy; DAP 213 — 2M DMSO + 1M acetamid + 3M glikolu propylenowego; DAP 2313-T-DAP 213 z dodatkiem

0,3M trehalozy; EPT — 4M glikolu etylenowego + 3,1M glikolu propylenowego + 0,3M trehalozy. Zarodki ekwilibrowano w sposób jedno- lub czterostopniowy, a następnie witryfikowano w jednej z mieszanin witryfikacyjnych. Ekwilibracja czterostopniowa okazała się korzystniejsza niż jednostopniowa. Równocześnie nie obserwowano różnicy między mieszaninami witryfikacyjnymi w metodzie czterostopniowej. Po rozmrożeniu uzyskano rozwój *in vitro* niewielkiego odsetka zarodków.

Dotychczas jest to pierwsze doniesienie dotyczące skutecznej witryfikacji zarodków świni.

6. Bydło

6.1. Oocyty (tab. 4)

Stosunkowo niewiele doświadczeń dotyczących witryfikacji oocytów bydłych przeprowadzono zarówno na oocytach niedojrzałych (GV) jak również na oocytach dojrzałych (meta II). Próby witryfikacji oocytów w stadium GV nie dały pozytywnych wyników (1,57), natomiast znaczny postęp uzyskano w witryfikacji oocytów w stadium metafazy II. Wydaje się, że czynnikiem decydującym o przeżywaniu witryfikowanych oocytów jest skład mieszaniny osłaniającej (10,11). W doświadczeniach nad witryfikacją oocytów w glikolu etylenowym, czy też w mieszaninie glicerolu i propandiolu, nie uzyskano przeżywalności *in vitro* (1) lub przeżywało tylko niewiele oocytów (57). Jednocześnie, witryfikacja 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 (11). Odznaczały się one dość dobrą zdolnością do zapłodnienia, a uzyskane po IVF blastocysty były zdolne do pełnego rozwoju *in vivo* (10,11). Innym czynnikiem prawdopodobnie decydującym o przeżywalności witryfikowanych oocytów bydłych w stadium metafazy II jest potrzeba wielostopniowego (np. 12-stopniowego) usuwania związków osłaniających podczas rozmrażania (10).

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

6.2. Zarodki (tab. 4)

Zarodki bydłce zostały po raz pierwszy witryfikowane (25) przy zastosowaniu procedury opracowanej dla zarodków mysich (45). Mieszanina witryfikacyjna składała się z 25% glicerolu + 25% 1,2-propandiolu. Usuwanie związków osłaniających po rozmrożeniu było jednostopniowe, przy użyciu roztworu 1M sacharozy. Efektywność transplantacji przy zastosowaniu opisanej metody wynosiła od 20 do 50% (23,25,50). Metoda ta była efektywna dla

TABELA 4
WITRYFIKACJA OOCYTÓW I ZARODKÓW BYDŁĘCYCH. METODY I WYNIKI

Rodzaj witryfikowanego materiału	Metody	Wyniki	Autorzy
Oocyty przed i po IVM	MW: 25% GLY + 25% PROH	<i>in vitro</i> : skuteczność zapłodnienia: witryfikowane przed IVM — 0%, po IVM — 2,5%	Watanabe i Oliveira Filho, 1992 (57)
przed i po IVM	MW: 8M EG	<i>in vitro</i> : po IVF — 0%	Avery i wspóln., 1992 (1)
po IVM	MW: I — 2M DMSO + 3M PG (DP-23), II — 2M DMSO + 1M Ac + 3M PG, (DAP-213)	<i>in vitro</i> : DP-23 — 85,9%, DAP-213 — 92,6% oocytów morfologicznie normalnych. Po IVF: DP-23 — 18%, DAP-213 — 10% blastocyst; <i>in vivo</i> : cielność 50% (3/6)	Hamano i Kuwayama, 1992 (11)
po IVM	MW: 2M DMSO + 1M Ac + 3M PG. DM: 2,0-0,1M S. D: 1- lub 12-stopniowa	<i>in vitro</i> : 10% (9/88) blastocyst. D: 12-stopniowa; <i>in vivo</i> : 2 ciążę na 3 transplantowane zarodki	Hamano i wspóln., 1992 (10)
Zarodki późne morule-wczesne blastocysty, blastocysty	MW: 25% GLY + 25% PROH	<i>in vitro</i> : późne morule-wczesne blastocysty — 42,8%; <i>in vivo</i> : późne morule-wczesne blastocysty — 53,8%, blastocysty — 0%	Massip i wspóln., 1986 (25)
późne morule-wczesne blastocysty, blastocysty	MW: 25% GLY + 25% PROH	<i>in vivo</i> : późne morule-wczesne blastocysty — 39,1%, blastocysty — 0%	Massip i wspóln., 1987 (26)
„połówki” zarodków od 6,5 do 8-dniowych	MW: 25% GLY + 25% PROH	<i>in vivo</i> : 28,6%	Massip i wspóln., 1987 (27)
„ćwiartki” 6,5-dniowych morul	MW: Massip i wspóln., 1987	<i>in vivo</i> : 1 cielę z 5 transplantowanych zarodków	Massip i wspóln., 1988 (28)
„połówki” morul i blastocyst w pustych ZP	MW: 25% GLY + 25% PROH	<i>in vitro</i> : hodowane przez 24 godz. — 20%, hodowane przez 3 godz. — 27%, hodowane przez 1 godz. — 50%, nie hodowane — 75%	Biełański i Hare, 1988 (3)
morule	MW: DMSO + Ac + PEG (Fahy i wspóln., 1985)	<i>in vivo</i> : 5 ciążę z 7 transplantowanych zarodków	Lopez-Gatus i Camon-Urgel, 1989 (23)
blastocysty	MW: 3,4M GLY + 3,4M PROH. E: 2-stopniowa. EM: GLY i GLY + S	<i>in vitro</i> : 20/35; <i>in vivo</i> : 7 ciąż z 14 transplantowanych zarodków	van der Zwalmen i wspóln., 1989 (60)

morule-blastocysty	MW: 4,11M GLY + 1M S	<i>in vitro</i> : 54,3%	Riha i współ., 1991 (42)
morula-wczesna blastocysta	MW: I — DMSO + Ac + PG + PEG, II — GLY + PG, III — EG + F + S. E: 1-stopniowa. DM: 0,5M S	<i>in vitro</i> : MW I — 3,6%, MW II — 0%, MW III — 88,7%	Mahmoudzadeh i współ., 1993 (24)
morula-wczesna blastocysta	MW: 30% GLY + 30% PROH. EM: I 10% GLY + 20% PROH; II 20% GLY + 25% PROH, III 30% GLY + 30% PROH. E: różne czasy, dwustopniowa	<i>in vitro</i> : E: I 80%, I + II 80-90%, I + III 90%; <i>in vivo</i> : E: I 25%, I + II 0-77,8%, I + III 25%; <i>in vivo</i> : E: 20%	Smorag i Gajda, 1994 (50)
Zarodki uzyskane <i>in vitro</i> blastocysty po IVMFC	MW: 25% GLY + 25% EG. EM: 10% GLY + 20% EG. E: różne czasy	<i>in vitro</i> : 71% — 84,1%	Yang i współ., 1992 (61)
blastocysty po IVMFC	MW + EM: GLY + PROH (0-45%). E: 1,2,4,8 i 16-stopniowa	<i>in vitro</i> : po ekwilibracji 1-16-stopniowej 56-100%, po ekwilibracji i witryfikacji 0-87%. Optymalna ekwilibracja 4, 8- i 16-stopniowa 79, 82 i 87%; <i>in vivo</i> : 60% (6/10) ciąży	Kuwayama i współ., 1992 (21)
morula-wczesna blastocysta po IVMFC	MW: 25% GLY + 25% PG + 0,4% BSA. EM: 10% GLY + 20% PG + 0,4% BSA. D: 1M S + 0,3M S lub 0,1M S	<i>in vitro</i> : 58% (14/24). D: 0,3M S	Dobrinsky i współ., 1992 (6)
blastocysta po IVMFC	MW: I — 25% GLY + 25% EG, II — 25% GLY + 25% PG, EM: GLY, EG, PG	<i>in vitro</i> : 51,1-80,8%. Najlepsze EM: EG — 10% GLY — 5 min, 10% GLY + 20% EG — 5 min, MW: 25% GLY + 25% EG	Yang i współ., 1992 (62)
blastocysta po IVMFC	MW: EG, GLY lub PG (40%) + 18% F + 0,3M S (EFS, GFS lub PFS)	<i>in vitro</i> : PFS — 33%, GFS — 53 lub 72% (1 lub 4 min E); <i>in vivo</i> : EFS — 80% (8/10), GFS — 50% (2/4) ciąży	Tachikawa i współ., 1993 (53)
morula-wczesna blastocysta po IVMFC	EM: GLY + PG	<i>in vitro</i> : E: 1 min — 50%, 2 min — 42%, 3 min — 30%, 4 min — 0%	Mahmoudzadeh i współ., 1993 (24)

Objaśnienia skrótów:

Ac — acetylamid, BTL — butandiol, DMSO — dwumetylosulfotlenek, EG — glikol etylenowy, F — fikor, GLY — glicerol, PEG — glikol polietylenowy, PG, PROH — glikol propylenowy, 1,2 — propanediol, S — sacharozę, BSA — albumina surowicy bydłowej, PBI — zmodyfikowany PBS, E — ekwilibracja, EM — medium ekwilibracyjne, D — rozcieńczenie, DM — medium do rozcieńczenia, MW — medium witryfikacyjne, IVM — *in vitro* — dojrzewanie *in vitro*, IVMFC — dojrzewanie *in vitro*, zapłodnienie i hodowla.

zarodków w stadium moruli, podczas gdy nie przeżyła żadna z wityfikowanych blastocyst. Przypuszcza się, że blastocysty są bardziej wrażliwe niż morule na wysoką koncentrację propandiolu w mieszaninie wityfikacyjnej. Z kolei wiadomo, że propandiol jest związkiem łatwiej przenikającym do komórki niż glicerol, co może być prawdopodobnie przyczyną uszkodzeń komórek natury chemicznej czy osmotycznej. Próby modyfikacji procedury wityfikacji polegające na wyeliminowaniu z mieszaniny ekwilibracyjnej propandiolu pozwoliły na skuteczną wityfikację blastocyst bydłecych (60), jakkolwiek obserwowana przeżywalność *in vitro* takich blastocyst była niezbyt wysoka (57,1%).

Zastosowanie do wityfikacji morul bydłecych oryginalnej mieszaniny wityfikacyjnej składającej się z DMSO, acetamidu, glikolu propylenowego i glikolu etylenowego (7,37) pozwoliło na uzyskanie po transplantacji normalnego potomstwa (23). Ponadto stwierdzono, że spośród wielu czynników wpływających na efekty przenoszenia wityfikowanych zarodków ważną rolę odgrywa czas między uzyskaniem zarodków, a ich wityfikacją (23). Według Lopez-Gattius i Camon-Urgel (23) czas ten nie powinien przekraczać 1 godziny. Z kolei aby uzyskać jak najlepsze rezultaty transplantacji wityfikowanych zarodków konieczna jest ostra selekcja dawczyń i biorczyń zarodków, jak również bardzo dokładna ocena morfologiczna zarodków przed wityfikacją i po rozmrożeniu (23).

Jednym z ważnych czynników wpływających na przeżywalność wityfikowanych zarodków jest ich ekwilibracja przed wityfikacją. Aby uniknąć niekorzystnego wpływu wysokich koncentracji związków osłaniających, zarodki poddaje się ekwilibracji wielostopniowej. W przeprowadzonych własnych doświadczeniach (50) z zarodkami bydłecymi ekwilibrowanymi trójstopniowo w mieszaninie glicerolu i propandiolu obserwowano wysoką przeżywalność zarodków *in vitro* (90%) jak i *in vivo* (77,8%). Obserwacje te potwierdzają wyniki uzyskane przez Kuwayama i współ. (21), którzy zastosowali wielostopniową ekwilibrację do wityfikacji blastocyst uzyskanych za pomocą metody zapłodnienia i hodowli *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 wityfikowane w mieszaninie glicerolu, płodowej surowicy bydłeczej i sacharozie przy zastosowaniu procedury bezpośredniego wkraplania zarodków do ciekłego azotu (42). Efektywność transplantacji wynosiła około 50%.

Z przeprowadzonych w ciągu ostatnich lat innych badań nad wityfikacją bydłecych morul i wczesnych blastocyst, na uwagę zasługują prace realizowane przez Leeuwa i współ. (22). Autorzy ci porównywali dwie procedury wityfikacji. Pierwsza, opiera się na mieszaninie glicerolu i albuminy bydłeczej, druga zaś, na mieszaninie glicerolu, propandiolu i albuminy bydłeczej. W obu metodach stosowano jednostopniowe usuwanie związków osłaniających przy użyciu roztworu sacharozy. Pierwsza procedura wityfikacji okazała się bardziej efektywna.

W poszukiwaniu optymalnej mieszaniny witryfikacyjnej dla zarodków bydłęcych, Mahmoudzadeh i współ. (24) przeprowadzili badania porównawcze trzech różnych mediów witryfikacyjnych. Najwyższy odsetek, blisko 90% zarodków rozwijających się *in vitro* stwierdzono po witryfikacji w mieszaninie glikolu etylenowego, fikolu i sacharozy.

Opracowanie efektywnych metod zapłodnienia *in vitro* wzbudziło zainteresowanie witryfikacją zarodków uzyskanych w wyniku kilkudniowej hodowli. Badania przeprowadzone w tym zakresie wskazują na możliwość witryfikacji takich zarodków (6,21,53,61,62). Szczególnie korzystna jest tutaj mieszanina glicerolu i propanodiolu (21), zwłaszcza jeśli jest użyta w połączeniu z wielostopniowym dodawaniem tych związków (21). Jednakże w badaniach prowadzonych przez Mahmoudzadeha i współ. (24) nie są potwierdzone przytoczone rezultaty. Autorzy ci wykazali, że już jednodominutowa 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 witryfikacji oparta na mieszaninie glicerolu i glikolu etylenowego, umożliwia przeżywalność zarodków *in vitro* w granicach 80% pod warunkiem, że czas ekwilibracji nie przekracza 2 minut (53), po tym okresie zaznacza się już toksyczne działanie glikolu etylenowego. Ta stosunkowo wysoka przeżywalność *in vitro* zarodków witryfikowanych w mieszaninie glicerolu i glikolu etylenowego została potwierdzona uzyskaniem ciąży (53).

W przedstawionym przeglądzie literaturowym dotyczącym witryfikacji zarodków bydłęcych uzyskanych zarówno w wyniku rozwoju *in vivo* jak i *in vitro* wykazano, że stosunkowo łatwo poddają się one kriokonserwacji poprzez witryfikację. Jednakże, nie należy zapominać, że w większości przytaczanych doświadczeń przeżywalność witryfikowanych zarodków była oceniana na podstawie rozwoju *in vitro*, a ponadto liczba użytych do doświadczeń zarodków była na ogół mała, aby wyciągać nie budzące wątpliwości wnioski.

W przekonaniu autorów rzeczywiste wyniki metod witryfikacji zarodków są niższe i pomimo przytaczanych przez wielu już autorów dobrych rezultatów przeżywania (11,21,25,42,50,53,60) metoda ta obecnie nie nadaje się jeszcze do praktycznego stosowania.

Literatura

1. Avery B., Schmidt M., Greve T., (1992), 12th Int. Congr. Anim. Reprod., The Hague, 3, 1421.
2. Bielański A., (1987), Cryo-Letters, 8, 294-301.
3. Bielański A., Hare W. C. D., (1988), Theriogenology, 29, 1, 223.
4. Boutron P., (1990), Cryobiology, 27, 55-69.
5. Chang Z. H., Baust J. G., (1991), Cryobiology, 28, 87-95.
6. Dobrinsky J. R., Stice S. L., Phillips P. E., Duby R. T., Robl J. M., (1992), Theriogenology, 37, 1, 202.
7. Fahy G. M., MacFarlane D. R., Angell C. A., Meryman H. T., (1984), Cryobiology, 21, 407-426.

8. Gajda B., Smoraǵ Z., Wierzbowski S., Jura J., Wiczorek B., (1989), *Zuchthygiene*, 24, 97-100.
9. Gajda B., Smoraǵ Z., (1993), *Theriogenology*, 39, 499-506.
10. Hamano S., Koikeda A., Kuwayama M., Nagai T., (1992), *Theriogenology*, 38, 1085-1090.
11. Hamano S., Kuwayama M., (1992), 12th Int. Congr. Anim. Reprod., The Hague, 3, 1421.
12. Ishimori H., Takahashi Y., Kanagawa H., (1992), *Theriogenology*, 37, 2, 481-487.
13. Ishimori H., Takahashi Y., Kanagawa H., (1992), *Theriogenology*, 38, 1175-1185.
14. Kasai M., Komi J. H., Takakamo A., Tsudera H., Sakurai T., Machida T., (1990), *J. Reprod. Fert.*, 89, 91-97.
15. Kasai M., Hamaguchi Y., Zhu S. E., Miyake T., Sakurai T., Machida T., (1992), *Biology of Reproduction*, 46, 1042-1046.
16. Kasai M., Nishimori M., Zhu S. E., Sakurai T., Machida T., (1992), *Biology of Reproduction*, 47, 1134-1139.
17. Kobayashi K., Nagashima H., Yamakawa H., Kato Y., Ogawa S., (1990), *Theriogenology*, 33, 4, 777-788.
18. Kono T.; Tsunoda Y., (1988), *Cryobiology*, 25, 197-202.
19. Kono T., Suzuki O., Tsunoda Y., (1988), *Cryobiology*, 25, 170-173.
20. Kono T., Kwon O. Y., Nakahara T., (1991), *Cryobiology*, 28, 50-54.
21. Kuwayama M., Hamano S., Nagai T., (1992), *J. Reprod. Fert.*, 96, 187-193.
22. de Leeuw A. M., den Daas J. H. G., Kruip Th. A. M., Rall W. F., (1992), 12th Int. Congr. Anim. Reprod., The Hague, 3, 1398.
23. Lopez-Gatius F., Camon-Urgel J., (1989), *Zuchthygiene*, 24, 255-258.
24. Mahmoudzadeh A. R., van Soom A., van Vlaenderen I., de Kruif A., (1993), *Theriogenology*, 39, 1291-1302.
25. Massip A., van der Zwalmen P., Scheffen B., Ectors F., (1986), *Cryo-Letters*, 7, 270-273.
26. Massip A., van der Zwalmen P., Ectors F., (1987), *Theriogenology*, 27, 1, 69-78.
27. Massip A., van der Zwalmen P., Ectors F., (1987), *Symp. Application of egg and embryo technologies to domestic animals*, Ed. Greve T., Copenhagen.
28. Massip A., van der Zwalmen P., Ectors F., (1988), *Ann. Med. Vet.*, 132, 483-487.
29. Massip A., van der Zwalmen P., Scheffen B., Ectors F., (1989), *Animal Reprod. Sci.*, 19, 117-129.
30. McGinnis L. K., Youngs C. R., (1990), *Theriogenology*, 33, 287.
31. Mehl P. M., (1992), *Cryo-Letters*, 13, 4.
32. Meryman H. T., Fahy G. M., (1991), 7 Symposium über Probleme der Tieftemperaturkonservierung von Zellen, Geweben und Organen, Abstract, Berlin, 6-8 Mai.
33. Miyake T., Kasai M., Zhu S. E., Sakurai T., Machida T., (1993), *Theriogenology*, 40, 121-134.
34. Nakagata N., (1989), *J. Reprod. Fert.*, 87, 479-483.
35. Papis K., Fujikawa S., Kojima T., Oguri N., (1993), *Cryobiology*, 30, 98-105.
36. Parks J. E., Ruffing N. A., (1992), *Theriogenology*, 37, 59-73.
37. Rall W. F., Fahy G. M., (1985), *Nature*, 313, 573-575.
38. Rall W. F., Fahy G. M., (1985), *Theriogenology*, 23, 220.
39. Rall W. F., (1987), *Cryobiology*, 24, 387-402.
40. Rall W. F., Wood M. J., Kirby C., Whittingham D. G., (1987), *J. Reprod. Fert.*, 80, 499-504.
41. Rall W. F., (1992), *Animal Reprod. Sci.*, 28, 237-245.
42. Riha J., Landa V., Kneissl J., Matus J., Jindra J., Kloucek Z., (1991), *Živoc. Vyr.*, 36, 113-120.
43. Rubinsky B., Arav A., Devries A. L., (1991), *Cryo-Letters*, 12, 93-106.
44. Schiewe M. C., Rall W. F., Stuart L. D., Wildt D. E., (1991), *Theriogenology*, 36, 279-293.

45. Scheffen B., van der Zwalmen P., Massip A., (1986), *Cryo-Letters*, 7, 260-269.
46. Shaw P. W., Bernard A. G., Fuller B. J., Shaw R. W., (1990), *Cryo-Letters*, 11, 427-432.
47. Shaw P. W., Fuller B. J., Bernard A., Shaw R. W., (1991), *Mol. Reprod. Dev.*, 29, 373-378.
48. Smorąg Z., Gajda B., Wieczorek B., Jura J., (1989), *Theriogenology*, 31, 1227-1231.
49. Smorąg Z., Gajda B., (1991), *Animal Reprod. Sci.*, 26, 151-158.
50. Smorąg Z., Gajda B., (1994), *Applied Biology Communication*, 4, 1-2, 27-31.
51. Sutton R. L., Pegg D. E., (1993), *Cryo-Letters*, 14, 1.
52. Szell A., Zhang J., Hudson R., (1990), *Reprod. Fertil. Dev.*, 2, 613-618.
53. Tachikawa S., Otoi T., Kondo S., Machida T., Kasai M., (1993), *Mol. Reprod. Develop.*, 34, 266-271.
54. Valdez C.A., Abas Mazni O., Takahashi Y., Hishinuma M., Kanagawa H., (1990), *Theriogenology*, 33, 627-636.
55. Valdez C. A., Hishinuma M., Takahashi Y., Kanagawa H., (1991) *J. Vet. Res.*, 39, 23-26.
56. Valdez C. A., Abas Mazni O., Takahashi Y., Fujikawa S., Kanagawa H., (1992), *J. Reprod. Fert.*, 96, 793-802.
57. Watanabe Y. F., Oliveira Filho E. B., (1992), 12th Int. Congr. Anim. Reprod., The Hague, 3, 1421.
58. Whittingham D. G., Leibo S. P., Mazur P., (1972), *Science*, 178, 411.
59. Wilmot I., (1972), *Life Sciences*, 11, 1071.
60. van der Zwalmen P., Touati K., Ectors F. J., Massip A., Beckers J. F., Ectors F., (1989), *Theriogenology*, 31, 270.
61. Yang N. S., Lu K. H., Polge C., (1992), 12th Int. Congr. Anim. Reprod., The Hague, 3, 1505.
62. Yang N. S., Lu K. H., Gordon I., Polge C., (1992), *Theriogenology*, 38, 326.
63. Yoshimo J., Kojima T., Shimizu M., Tomizuka T., (1993), *Cryobiology*, 30, 413-422.
64. Zhu S. E., Kasai M., Ootoge H., Sakurai T., Machida T., (1993), *J. Reprod. Fert.*, 98, 139-145.

Vitrification of mammalian oocytes and embryos

Summary

Vitrification is a new approach to oocyte and embryo cryoconservation. It consists in the solidification of a solution caused by drastic increase in viscosity during cooling and not by crystallization. The application of this approach to cryoconservation of oocytes and embryos of different species depends upon the development of proper procedures and non-toxic media. From the technical point of view, the vitrification method is simple and relatively easily applicable under field conditions. The authors review the current procedures applied to oocytes and embryos of laboratory and farm animals.

Key words:

vitrification, oocyte, embryo, mouse, rabbit, sheep, pig, cattle.

Adres dla korespondencji:

Zdzisław Smorąg, Zakład Fizjologii Rozrodu Zwierząt,
Instytut Zootechniki, 32-083 Balice, k. Krakowa.