

# Rozwój metod konserwacji zarodków świń

MARCIN JEZIORKOWSKI, PAWEŁ ANTOSIK, JĘDRZEJ M. JAŚKOWSKI

Katedra Weterynarii Rolniczej Wydziału Hodowli i Biologii Zwierząt AR, ul. Wojska Polskiego 28, 60-625 Poznań

Jeziorkowski M., Antosik P., Jaśkowski J. M.

## Development of cryoconservation methods in pig embryos

### Summary

This review presents evolution and current possibilities, state of knowledge and prospects for cryopreservation of pig embryos. In the early stages the development of this technology for use in the international pig industry was slow. Initially freezing technologies utilized the stepwise method to cryopreserve swine embryos. Conventional freezing methods will not work for pigs embryos, which are extremely sensitive to slow cooling below temperatures of approximately 15°C, since, as they cool, they undergo physiological and structural changes that leave them incapable of normal development. Using a rapid cooling processes – vitrification – is thought to outpace the damaging effects of slow cooling. It allows for an increase of the cryopreserved pig embryo survival rate to more than 80% in the laboratory. At present, vitrification is regarded as an alternative to traditional slow freezing procedures which do not offer satisfactory results for the cryopreservation of porcine embryos. Recently a novel approach consisting of a minimum sample size, increased cooling rate from 2500 C/min to 20.000 C/min, and the use propylene and ethylene glycol in the vitrification solution have been effective for cryopreservation of pig embryos. Many factors such as the stage of embryonic development, cryoprotectant toxicity, the composition of vitrification solution, cooling and warming rates can influence the survival of pig embryos after vitrification. Peri-hatching and hatched blastocysts tolerate slow freezing without special pre-treatment, while morula and early blastocysts do not survive this cryopreservation procedure. Vitrification results in higher survival rates after warming when untreated early-to-hatched-blastocysts-stage embryos are used. An increase in cooling rate decreases sensitivity to slow freezing and may permit a reduction of cryoprotectant concentration.

**Keywords:** cryoconservation, pig embryos

U świń, w przeciwieństwie do innych gatunków zwierząt, nie opracowano dotąd skutecznych i prostych metod konserwacji zarodków (13, 20). Pewne nadzieje wiąże się z opracowaniem skutecznych metod witrifikacji gwarantującej uzyskanie satysfakcjonujących rezultatów. Zastosowanie gwałtownego zamrażania pozwala uniknąć uszkodzeń powstających podczas stosowania metody tradycyjnej. W efekcie uzyskuje się wzrost przeżywalności zarodków świń w warunkach *in vitro* do poziomu 80%, satysfakcjonującą liczbę ciąż oraz zwiększenie liczby prosiąt. Nowszym osiągnięciem w metodzie witrifikacji jest zmniejszenie objętości próby, zwiększenie prędkości mrożenia oraz użycie glikolu propylenowego i etylenowego w roztworach witrifikacyjnych, zwiększających efektywność procesu zamrażania zarodków świń.

W niniejszym opracowaniu przedstawiono rozwój i bieżące możliwości oraz poziom wiedzy odnośnie do rozwoju metod kriokonserwacji zarodków świń (11, 12).

### Metoda trójstopniowa

Pierwsze udane próby zamrażania zarodków świni przeprowadzono pod koniec lat 80. ub. wieku. Proces mrożenia metodą trójstopniową odbywa się z prędkość-

cią odp. około 1°C oraz 0,3°C/min. do temperatur odp. -6°C lub -7°C oraz -35°C do -37°C. Następnie zarodki umieszczane są w oparach ciekłego azotu (LN). W celu uniknięcia szoku osmotycznego rozmrażanie odbywa się w temperaturze 35°C do 37°C w roztworach sacharozy 0,5-0,3 M, a nawet 0 M. (21, 22). Najwyższa efektywność mrożenia metodą tradycyjną dotyczy zarodków w stadium ekspandującej lub wylęgłej blastocysty, podczas gdy wczesne stadia rozwojowe (morula i wczesna blastocysta) źle znosiły działania niskich temperatur (7).

Jedną z podstawowych trudności pojawiających się podczas mrożenia zarodków świń jest obecność lipidów wewnątrzkomórkowych. Podczas zamrażania dochodzi do naruszenia ich integralności, a w efekcie do uszkodzenia błon cytoplazmatycznych i nieodwracalnych zmian degeneracyjnych (23). Największe ilości lipidów stwierdza się w zarodkach we wczesnych stadiach rozwojowych (2-8-komórkowych). Jednym ze sposobów zapobiegania uszkodzeniom powstałym w związku z obecnością tłuszczu w zarodku jest ich mechaniczne usunięcie z komórek. W tym celu dokonywano polaryzacji ziaren tłuszczowych w cytoplazmie, a następnie usuwano je przy pomocy mikropipe-

ty. Następnie zarodki umieszczano na 1 h w pożywce do krótkotrwałej hodowli i konserwacji z 10% dodatkiem cielej surowicy płodowej (FCS) oraz pożywce Whittnesa z dodatkiem 1,5% BSA, o temperaturze 4°C. Mechaniczne usunięcie lipidów umożliwiło dalszy rozwój 60% zarodków ze stadium 2-4 komórkowego do blastocysty. Spośród zarodków mrożonych metodą trójstopniową w obecności 1,5 M 1,2 propanodiolu zdolność do dalszego rozwoju po rozmrożeniu wykazywało 40,6%, jednak stadium blastocysty osiągnęło zaledwie 12,5%. Dla porównania, po rozmrożeniu zarodków, z których nie usuwano lipidów, żaden zarodek nie wykazywał zdolności do dalszego rozwoju (23). Istotną przeszkodą w stosowaniu tej metody na szeroką skalę są wysokie koszty zabiegu (22).

W badaniach nad efektywnością procesu zamrażania zarodków zwracano także uwagę na toksyczny wpływ zastosowanych środków osłaniających. W badaniach porównawczych oceniano wpływ trzech różnych substancji osłaniających: glikolu etylenowego i propylenowego oraz glicerolu. W badaniach wykorzystano wyłącznie wykluwające się blastocysty, które mrożono z zastosowaniem glicerolu – z dodatkiem 20% cielej surowicy płodowej (FCS) i 20% surowicy cielej Calf Supreme™ albo TCM 199 względnie – 4% glikolu etylenowego, glikolu propylenowego oraz dekstranu z dodatkiem 20% Supreme™. Proces mrożenia przeżyło 44% zarodków (29%-65%), z których przeciętnie 23% oceniono jako zdadne do transferu po 2-godzinnej hodowli w pożywce standardowej. W wyniku transferu zarodków urodziło się 2-5 prosiąt. Powyższe badania dowiodły, że zastosowanie dwóch substancji osłaniających – glikolu etylenowego i propylenowego – zwiększa prawdopodobieństwo uzyskania żywego potomstwa po transferze rozmrożonych zarodków (15, 17).

Stwierdzono wysoką skuteczność metody wolnego zamrażania zarodków w stadium poprzedzającym wyklucie i wykluwania się. Wczesne stadia rozwojowe zarodka bez dodatkowych zabiegów oraz manipulacji wewnątrz komórkowych nie wykazują zdolności do dalszego rozwoju po rozmrożeniu (22, 23). W związku ze stosunkowo niską efektywnością tradycyjnej metody konserwacji zarodków świni poszukiwano alternatywnych metod konserwacji pozwalających na optymalizację procesu mrożenia i jego wyższą efektywność.

Tabela 1 przedstawia efektywność tradycyjnych metod mrożenia zarodków świni – substancje osłaniające, stadium rozwoju mrożonych zarodków oraz liczbę urodzonych prosiąt.

## Witryfikacja

W ostatnich latach badania z zakresu kriokonserwacji zarodków świni koncentrowały się na ich witryfikacji. Witryfikacja, czyli zeszklenie jest procesem gwałtownego schładzania, które powoduje wzrost lepkości skoncentrowanej mieszaniny substancji osłaniających i zapobiega powstawaniu kryształów lodu wewnątrz struktury komórkowej zarodka. Powstałe amorficzne formy zeszklenia umożliwiają równomierne zawieszenie zarodków w cieczy, która zachowuje normalne molekularno-jonowe funkcje, lecz przypomina swoją strukturą ciało stałe. Główny problem w wykorzystaniu tej metody stanowi opracowanie właściwego składu mieszaniny witryfikacyjnej, by zneutralizować chemiczną szkodliwość użytych substancji na dalszy rozwój zarodka i uzyskać pożądaną skuteczność metody (8, 9).

Środki osłaniające, stosowane podczas konserwacji zarodków, dzielone są na: drobnocząsteczkowe, rozpuszczalne w wodzie, przenikające do wnętrza zarodka przez błony komórkowe, takie jak: glicerol, DMSO, glikol etylenowy i propylenowy, związki wielkocząsteczkowe nieprzenikające do wnętrza komórki ułatwiające witryfikację, jak: poliwinylpirolidyna, glikol polietylenowy oraz dekstran, substancje przeciwmroźniowe oraz naturalne związki białkowe.

W celu oceny składu roztworu witryfikacyjnego stosowano: EFT składającą się z 7,2 M glikolu etylenowego, 0,003 M ficolu i 0,3 M trechalozy; DAP 213 z 2 M DMSO, 1 M acetamidem, 3 M glikolem propylenowym; DAP 213-T o składzie 2 M DMSO, 0,3 M trechalozy; EPT z 4 M glikolem etylenowym i 3,1 M glikolem propylenowym. W teście na toksyczność zarodki poddawano cztero- lub jednostopniowej ekwilibracji. Nie stwierdzono istotnych różnic pomiędzy zastosowanymi roztworami witryfikacyjnymi. Odsetek przeżywających zarodków poddanych działaniu mieszanin witryfikacyjnych był niższy niż przypadku zarodków umieszczonych w pożywce nie zawierającej związków osłaniających. Czteroetapowa ekwilibra-

**Tab. 1. Efektywność tradycyjnych metod mrożenia zarodków świni – substancje osłaniające, stadium rozwoju mrożonych zarodków oraz liczba urodzonych prosiąt**

Sposób mrożenia (temperatura °C)	Związki osłaniające	Stadium rozwoju zarodka	Przeżywalność zarodków	Piśmiennictwo
Powolne mrożenie (-35°C)	1,5 M DMSO PBS + 16% FCS	EXB	<i>In vivo</i> 5 prosiąt/11 zarod.	Hayasi i wsp. 1989
Powolne mrożenie (-196°C)	1,5 M glicerol + 0,05% lecytyna PBS + 15% FCS	EXB	<i>In vivo</i> 4 prosięta/20 zarod.	Kameyama i wsp. 1990
Powolne mrożenie (-196°C)	1,5 M glicerol PBS + 16% FCS	EXB, WB, <i>in vitro</i> WB	<i>In vitro</i> EXB – 51%, WB – 69% <i>in vitro</i> WB – 82%	Nagashima i wsp. 1992
Powolne mrożenie (-196°C)	1,4 M glicerol + 10% żółtka jaja	WB	<i>In vivo</i> 1 prosię/6 zarod.	Fujino i wsp. 1993

Objaśnienia: stadium zarodka EXB – ekspandująca blastocysta, WB – wczesna blastocysta

cja była korzystniejsza niż jednostopniowa, szczególnie w odniesieniu do blastocyst. Nie stwierdzono istotnych różnic pomiędzy zastosowanymi roztworami witrifikacyjnymi w odniesieniu do metody czteroeta-powej. Określając skuteczność protokołu witrifikacji zarodki poddane zostały szybkiemu mrożeniu w 0,25 ml słomkach, które umieszczono w ciekłym azocie (LN). Po rozmrożeniu nie stwierdzono znaczących różnic w odniesieniu do odsetka rozwijających się zarodków; we wszystkich próbach był on podobny, z wyjątkiem blastocyst z grupy EPT, w której wskutek mrożenia zamierało 60-100% zarodków (26).

Ważnym elementem protokołu witrifikacji jest ekwilibracja stosowana przed umieszczeniem zarodków w roztworze witrifikacyjnym, a następnie podczas usuwania substancji osłaniających, polegająca odpowiednio na przenoszeniu zarodków z roztworu witrifikacyjnego o niższym stężeniu do roztworu o stężeniu wyższym w przypadku zamrażania zarodków i odwrotnie w przypadku ich rozmrażania. Proces ten prowadzi do dehydratacji zarodków, a wodę zastępuje stężona substancja osłaniająca. Zarodki poddawano 5- lub 15-minutowej ekspozycji na 2 M glikol etylenowy, a następnie umieszczano w słomkach o poj. 1,25 ml w 8 M EG z dodatkiem 7% roztworu poliwinylpirolidyny (PVP) i ciągu 40 s wprowadzano do ciekłego azotu (LN). Po rozmrożeniu z zarodków usuwano 2 M EG stosując roztwór 1,7 M galaktozy i poddawano hodowli w modyfikowanej pożywce CZB. Po 48 h hodowli procentowa przeżywalność poddawanych witrifikacji zarodków w stadium wczesnej blastocysty wynosiła 21%, blastocysty 32% i późnej blastocysty 13%, przy metodzie bezpośredniej, 9,40 i 21% dla jednostopniowej ekwilibracji oraz 35, 85 i 71% przy dwustopniowej ekwilibracji (18). Zbliżone wyniki uzyskiwano wówczas, gdy jako środków osłaniających użyto EG i jego kombinacji z PVP. Zarodki poddano 5-minutowej ekspozycji na 2 M EG, a następnie umieszczano w słomkach w 8 M mieszaninie wym. środków osłaniających i wprowadzono do LN. Po rozmrożeniu zarodki hodowano w pożywce CZM. Przeżywalność wczesnych, wykluwających się i późnych blastocyst wynosiła w hodowli *in vitro* po 24 h 39,6 i 20,3%, a po 48 h 25 i 13%. Spośród zarodków będących w pięciu różnych stadiach rozwojowych, poddanych witrifikacji i zamrożonych na dwa dni w ciekłym azocie po 48 h przeżyło do 100% wykluwających się i 20% późnych blastocyst (19). Fakt ten wskazuje, że oprócz ekwilibracji, niezbędny jest także odpowiedni dobór parametrów witrifikacji oraz związków osłaniających (15, 18). Natomiast rodzaj stosowanych związków osłaniających w mieszaninie witrifikacyjnej nie ma decydującego wpływu na efektywność witrifikacji. Poszczególne stadia rozwojowe zarodków świni wymagają zastosowania odpowiednich kombinacji substancji osłaniających (15).

### „Otwarte” metody witrifikacji

Ostatnio opracowano tzw. otwarte metody witrifikacji. Termin metody „otwarte” wynika z faktu bezpośredniego kontaktu witrifikowanego płynu z ciekłym azotem. Częściej metody te określa się jako metody witrifikacji w zminimalizowanych próbach lub kroplach. Wśród nich wyróżnia się cztery metody: OPS (Open Pulled Straw), która opiera się na maksymalnym ograniczeniu ilości płynu zawierającego witrifikowane zarodki (bydło, świnię), metodę kropelkową, w której witrifikacja zarodków zachodzi w kropli roztworu, wprowadzanego w opary ciekłego azotu (bydło, świnię), metodę pętłkową stosowaną przy krio-konserwacji zarodków chomika i człowieka, a polegającą na nanoszeniu zarodków na nylonową nić oraz metodę siateczki mikroskopowej, w której na miedzianą siateczkę o średnicy oczek 3  $\mu\text{m}$  nanosi się roztwór substancji osłaniających wraz z zarodkami, a następnie umieszcza w ciekłym azocie. Zaletą tych metod jest osiągnięcie tempa zamrażania zarodków w granicach od 10 do 40 tys.  $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ . w efekcie szybszego przejścia komórek przez szkodliwy dla nich przedział temperatur (od  $+20^{\circ}\text{C}$  do  $-20^{\circ}\text{C}$ ), wyeliminowania stężonych środków osłaniających oraz skrócenia czasu przebywania zarodków w mieszaninie roztworów witrifikacyjnych do ok. 20-30 sekund. Sam proces zeszklenia jest szybszy i skuteczniejszy (24).

Rodzaj mieszaniny witrifikacyjnej i genotyp zarodka miały wpływ na efektywność OPS. Zarodki loszek rasy wielkiej białej (LWh) oraz meishan (MS) umieszczano w dwóch różnych roztworach witrifikacyjnych, z których pierwszy zawierał TCM (zbuforowany hepes TCM199 z dodatkiem 20% pożywki NBCS), drugi natomiast PBS (PBS z dodatkiem 20% pożywki NBCS). Po dwustopniowej ekwilibracji w glikolu etylenowym, sulfotlenku dwumetylu (DMSO) i sacharozy 2-5 blastocyst umieszczano w słomkach OPS i zanurzano w ciekłym azocie. Po rozmrożeniu blastocysty świń LWh, zamrażane w PBS wykazywały niższą przeżywalność w warunkach *in vitro* niż zarodki świń MS (27 wobec 67%). Zarodki umieszczane w mieszaninie zawierającej TCM wykazywały porównywalną przeżywalność (LWh – 41%, MS – 43%). Odsetek przeżywających morul umieszczanych w PBS był niski i wynosił 11% dla LWh i 14% dla MS. Zanotowano także pewne różnice w odniesieniu do efektywności transferu zarodków u obu ras świń. Przykładowo, dokonując transferu 20 blastocyst u świń rasy MS, uzyskiwano średnio 4 prosięta, podczas gdy u świń rasy LWh – 5 prosiąt.

W innych badaniach uzyskiwano 80% odsetek loch ciężarnych w 25 dniu ciąży oraz 70% poziom wyproszeń, dokonując transferu 20 morul do każdej z 10 przygotowanych uprzednio biorczyń. Morule z nienaruszoną osłonką przejrzystą poddawano witrifikacji po dwustopniowej ekwilibracji z zastosowaniem glikolu etylenowego, DMSO i sacharozy w TCM199

z 20% pożywką NBCS. W badaniach używano zmodyfikowanej mieszaniny witryfikacyjnej stosowanej do zamrażania zarodków myszy – NCSU23 z dodatkiem cytochalazyny B. Dodatek cytochalazyny B zapobiega depolimeryzacji aktyny w strukturach cytoszkieletu komórek zarodka. Po ekwilibracji w glikolu etylenowym zarodki umieszczano w ciekłym azocie i szybko zamrażano w temperaturze  $-204^{\circ}\text{C}$  (4). W badaniach terenowych po transferze wczesnych blastocyst mrożonych metodą OPS uzyskiwano 29% ciąży. Odsetek rodzących loszek wynosił 21,6%, a przeciętna liczba prosiąt w miocie 8,2. Równocześnie nie stwierdzono znaczących różnic w liczbie rodzących się prosiąt w odniesieniu do zarodków pozyskiwanych od loch lub loszek. Efektywność OPS może być zależna od typu słomek stosowanych podczas procesu mrożenia. Dotychczas używano słomek zgrzewanych na końcach typu heat-sealed (HS) oraz słomek o otwartych zakończeniach tzw. open straw (OS). Przeżywalność po rozmrożeniu, przy zastosowaniu słomek OS w odniesieniu do blastocyst wyniosła zarówno po 24, jak i 48 godzinach 58,8%. Tymczasem po zastosowaniu słomek HS przeżyło w analogicznych okresach tylko 15,4% zarodków. Przeżywalność zarodków traktowanych cytochalazyną B i witryfikowanych w 6,5 M glicerolu oraz 6% BSA po ich zamrożeniu w słomkach HS lub OS znacząco poprawiało wirowanie. W przypadku stosowania słomek HS przeżywało po 24 godz. 62,8%, a po 48 godz. 60,5% zarodków oraz w przypadku słomek OS – 75 i 63,3% zarodków po 24 i 48 godzinach. Umieszczenie zarodków w cytochalazynie B oraz witryfikowanie w 8 M glikolu etylenowym i 7% PVP przeżywalność przypadku zastosowania słomek OS pozwalało poprawić przeżywalność zarodków po 24 godzinach do 80 i 76,7% po 48 godzinach hodowli (7, 18).

W metodach „otwartych” witryfikacja zarodków we wczesnych stadiach rozwojowych pozwala po rozmrożeniu na rozwój większej liczby zarodków oraz zmniejsza ryzyka niekorzystnego wpływu czynników zewnętrznych (mikroorganizmy chorobotwórcze) (4). Stwierdzono również, że decydujący wpływ na nieodwracalne zniszczenia struktury cytoszkieletu zarodka we wczesnym stadium rozwoju wywiera temperatura mrożenia ( $-196^{\circ}\text{C}$ ). Niekorzystny wpływ stężonych substancji osłaniających oceniany jest jako drugorzędny. Zastosowanie cyto-B nie powoduje wzrostu przeżywalności mrożonych zarodków poddawanych uprzednio procesowi witryfikacji, jednak zwiększa trzykrotnie odsetek przeżywających zarodków w stadium ekspandującej blastocysty (do 60%) i wylęgłej blastocysty, o ile ich średnica jest mniejsza od  $400\ \mu\text{m}$  (do 90%) (7).

Metoda OPS gwarantuje po rozmrożeniu dość wysoką przeżywalność zarodków świni w stadium moruli i blastocysty. Dowodzą tego badania, w których po wcześniejszej hodowli zarodków w pożywce NCSU-23 poddawano je 2-stopniowej ekwilibracji

w mieszaninie witryfikacyjnej EFS zawierającej 40% glikolu etylenowego, 18% fikolu i 0,3 sacharozy. Następnie zarodki przenoszono do słomek, mrożono i przechowywano w ciekłym azocie od 3 do 6 miesięcy. Po rozmrożeniu i usunięciu substancji osłaniających zarodki przenoszono do jajowodu lub macicy biorczyń. Spośród 8 biorczyń, którym wprowadzono do jajowodów ogółem 147 blastocyst, u 5 stwierdzono ciążę w 30. dniu po zabiegu, uzyskując od 3 (37,5%) po oproszeniu 18 prosiąt (13). W wyniku domacicznej transplantacji zarodków nie uzyskano ich pełnego rozwoju *in vivo*.

Obecnie prowadzone są badania nad udoskonaleniem metody OPS dla zarodków we wczesnych stadiach rozwoju (tj. moruli i wczesnej blastocysty) i nie naruszoną osłonką przejrzystą. Istotnym czynnikiem, mającym wpływ na efektywność metody jest w tym przypadku prędkość zamrażania. Można ją znacząco przyspieszyć, stosując słomki typu SOPS (superfine open pulled straw) oraz aparat Vit-Master, pracujący w warunkach obniżonego ciśnienia i umożliwiający obniżenie temperatury LN<sub>2</sub> do  $-210^{\circ}\text{C}$ . Dowodzą tego badania, w których zarodki poddawano witryfikacji z zastosowaniem mieszaniny TCM 199 z dodatkiem 20% płodowej surowicy cielęcej według protokołu opisanego przez Berthelotego i wsp. (3, 5) i bezpośrednio po czterostopniowej ekwilibracji, w liczbie 4 do 6 sztuk przenoszono do słomek typu SOPS lub OPS oraz umieszczono pionowo w LN<sub>2</sub>. Pozostałą część zarodków w słomkach typu SOPS wprowadzano do aparatu Vit-Master. Po 15 dniach przechowywania zarodki rozmrożono i ekwilibrowano w pożywce TCM-NBCS, a następnie poddawano hodowli *in vitro* przez 96 h w pożywce TCM 199 z dodatkiem 10% FCS, w temperaturze  $39^{\circ}\text{C}$ , z 5% zawartością CO<sub>2</sub> w powietrzu. Odsetek zarodków w stadium moruli przeżywających proces mrożenia przy użyciu OPS, SOPS oraz Vit-Master – SOPS wyniósł 56,3%, 57,4% oraz 67,6%, natomiast w stadium wczesnej blastocysty – 81,8%, 76,9% i 94,7%. Redukcja grubości ścian słomki oraz minimalizacja objętości próby zastosowana w rurkach typu SOPS pozwoliły na zwiększenie prędkości mrożenia nawet do  $40\ 000^{\circ}\text{C}/\text{min}$ . Określono również optymalną szybkość mrożenia zarodków świń na nie większą niż  $20\ 000^{\circ}\text{C}/\text{min}$ . (5).

Stosunkowo najnowszym osiągnięciem w procesie mrożenia zarodków świń jest zastosowanie kropelkowej metody witryfikacji. Umożliwia ona pominięcie dodatkowych zabiegów (wstępna hodowla zarodka) oraz manipulacji wewnątrzkomórkowych. Zarodki w stadium moruli i wczesnej blastocysty umieszczane są bezpośrednio w roztworze witryfikacyjnym, zawierającym 40% glikol etylenowy 0,6 M sacharozę i 2% glikol polietylenowy (ESP). Po przeprowadzeniu trój- lub czterostopniowej ekwilibracji, zarodki umieszczone w kropli o maksymalnej objętości 1  $\mu\text{l}$  przenoszono na czubek pipety. Formującą się na nim kroplę schładzano, a następnie zanurzano w parach

ciekłego azotu. Po odcięciu kropla ESP wraz z końcówką pipety przechowywana jest w specjalnej tubie. Po rozmrożeniu zarodków i ich inkubacji *in vitro* odsetek rozwijających się morul i wczesnych blastocyst wynosił odpowiednio: 91,3 i 69,6%. Wysoki był także odsetek urodzonych prosiąt w stosunku do liczby zarodków przeniesionych do macicy pięciu biorczyń, który dla morul wynosił 31,4%, a dla blastocyst 20% (21). Reasumując, zastosowanie ultraszybkich metod mrożenia umożliwia mrożenie zarodków we wczesnych stadiach rozwoju. Tym samym pominąć można proces usuwania związków lipidowych, stabilizację cytoszkieletu lub odwirowywanie substancji osłaniających (5).

### Piśmiennictwo

1. *Beeb L. F., Cameron R. D., Blackshaw A. W., Higgins A., Nottle M. B.*: Piglets born from centrifuged and vitrified early and peri-hatching blastocysts. *Theriogenology* 2002, 57, 2155-2165.
2. *Berthelot F., Martinat-Boite F., Perreau C., Terqui M.*: Birth of piglets after OPS vitrification and transfer of compacted morula stage embryos with intact zona pellucida. *Reprod. Nutr. Dev.* 2001, 41, 267-272.
3. *Berthelot F., Martinat-Boite F., Perreau C., Terqui M.*: Piglets born after vitrification of embryos using the open pulled straw method. *Cryobiology* 2000, 41, 116-124.
4. *Cameron R. D., Beebe L. F., Blackshaw A. W., Keates H. L.*: Farrowing rates and litter size following transfer of vitrified porcine embryos into a commercial swine herd. *Theriogenology* 2004, 56, 1533-1543.
5. *Cuello C., Antonia Gil M., Parrilla I., Tornel J., Vazquez J. M., Roca J., Berthelot F., Martinat-Boite F., Martinez E. A.*: Vitrification of porcine embryos at various developmental stages using different ultra-rapid cooling procedures. *Theriogenology* 2004, 62, 353-361.
6. *Cuello C., Berthelot F., Martinat-Boite F., Guillouet Ph., Furstoss V., Boisseau Ch., Manceau P., Locatelli A., Martinez E. A.*: Transfer of vitrified blastocysts from one or two superovulated Large White hyperprolific donors to Meishan recipients: reproductive parameters at day 30 of pregnancy. *Theriogenology* 2004, 61, 843-850.
7. *Drobinsky J. R., Pursel V. G., Long C. R., Johnson L. A.*: Birth of piglets after transfer of embryos cryopreserved by cytoskeletal stabilization and vitrification. *Biol. Reprod.* 2000, 62, 564-570.
8. *Drobinsky J. R.*: Cryopreservation of swine embryos: a chilly past with a vitrifying future. *Theriogenology* 2001, 56, 1333-1344.
9. *Drobinsky J. R.*: Cryopreservation of pig embryos, adaptation of vitrification technology for embryo transfer. *Reprod. Suppl.* 2001, 58, 325-333.
10. *Fujino Y., Ujisato Y., Endo K., Tomizuka T., Kojima T., Oguri N.*: Cryoprotective effect of egg yolk cryopreservation of porcine embryos. *Cryobiology* 1993, 30, 299-305.
11. *Gajda B., Smorąg Z.*: Survival of pig morula and blastocyst after exposure to vitrification media or vitrification. *CryoLetters* 2000, 21, 231-236.
12. *Gajda B., Smorąg Z.*: Kriokonserwacja oocytów i zarodków świni. *Biotechnologia* 2003, 60, 138-150.
13. *Gajda B., Smorąg Z.*: Prosięta uzyskane po transplantacji wityfikowanych blastocyst; *Medycyna Wet.* 2004, 60, 371-373.
14. *Hayashi S., Kobayashi K., Mizuno J., Saitoh K., Hirano S.*: Birth of piglets from frozen embryos. *Vet. Rec.* 1989, 125, 43-44.
15. *Jaśkowski J. M., Twardoń J., Zbylut J., Czech K.*: Konserwacja zarodków świń – metody, ich skuteczność oraz główne problemy. *Medycyna Wet.* 1999, 55, 655-657.
16. *Kameyama K., Takedomi T., Itakura H., Onihara T.*: Effect of lecithine on cryopreservation of porcine embryos. *Proc. 78<sup>th</sup> Ann. Conf. Japanese Society of Animal Reproduction.* Nigata, Japan 1990, 22 abstr.
17. *Kameyama K., Kudoh O., Takedomi T., Fukawa K.*: Transfer of cryopreserved pig embryos. *Theriogenology* 1997, 47, 366.
18. *Kobayashi S., Takei M., Kano M., Tomita M., Leibo S.*: Piglets produced by transfer of vitrified porcine embryos after stepwise dilution of cryoprotectants. *Cryobiology* 1998, 36, 20-31.
19. *Kuwayama M., Holm P., Jacobsen H., Greve T., Callesen H.*: Successful cryopreservation of porcine embryos by vitrification. *Vet. Rec.* 1997, 141, 365.
20. *Misumi K., Suzuki M., Sato S., Saito N.*: Successful production of piglets derived from vitrified morulae and early blastocysts using a microdroplet method. *Theriogenology* 2003, 60, 253-260.
21. *Nagashima H., Yamakawa H., Niemann H.*: Freezability of porcine blastocysts at different peri-hatching stages. *Theriogenology* 1992, 37, 839-850.
22. *Nagashima H., Kashiwazaki N., Ashman R., Grupen C., Seemark R. F., Nottle M.*: Recent advances in cryopreservation of porcine embryos. *Theriogenology* 1994, 41, 113-118.
23. *Nagashima H., Kuwayama M., Grupen C. G., Ashman R. J., Nottle M. B.*: Vitrification of porcine early cleavage stage embryos and oocytes after removal of cytoplasmic lipid droplets. *Theriogenology* 1996, 45, 180 (abstr.)
24. *Papis K.*: „Otwarte” metody wityfikacji komórek i ich zastosowanie do kriokonserwacji oocytów i zarodków ssaków. *Medycyna Wet.* 2001, 57, 547-551.
25. *Smidt D., Niemann H.*: Biotechnology in genetics and reproduction. *Live-stock Prod. Sci.* 1999, 59, 207-221.
26. *Yoshino J., Kojima T., Shimizu M., Tomizuka T.*: Cryopreservation of porcine blastocysts by vitrification. *Cryobiology* 1993, 30, 413-422.

Adres autora: mgr inż. Marcin Jeziorkowski, ul. Św. Jerzego 9A/7, 61-546 Poznań; e-mail: marjezo@wp.pl