

Aktualny stan i możliwości kriokonserwacji oocytów świni*

Barbara Gajda

*Instytut Zootechniki Państwowy Instytut Badawczy, Dział Biotechnologii Rozrodu Zwierząt,
32-083 Balice k. Krakowa*

Opracowanie efektywnych metod kriokonserwacji oocytów i zarodków świni, które na tle innych gatunków zwierząt gospodarskich wymagają dalszego rozwoju, stworzy dogodne warunki międzynarodowego obrotu izolowanym materiałem genetycznym, eliminując wiele problemów związanych np. z eksportem i importem zwierząt. Z kolei, rozwój nowych technologii w rozrodzie świń, takich jak pozaustrojowe zapłodnienie i produkcja zarodków *in vitro*, czy też dotyczących uzyskiwania zwierząt transgenicznych i ich klonowania wiąże się z dużym zapotrzebowaniem na oocyty i zarodki. Metody te zyskują w ostatnich latach bardzo szybko na znaczeniu ze względu na ich duży potencjał w otrzymywaniu świń dla potrzeb biomedycznych, takich jak ksenotransplantacja czy modele biomedyczne. W tej sytuacji dysponowanie materiałem kriokonserwowanym, zwłaszcza oocytów byłoby dużym ułatwieniem metodycznym i organizacyjnym w rozwoju tych technologii.

Niezależnie od gatunku ssaków, podatność oocytów na kriokonserwację jest znacznie niższa niż zarodków. Wprawdzie w ciągu ostatnich kilkunastu lat została znacznie pogłębiona wiedza dotycząca procesów związanych z kriokonserwacją oocytów, jednakże wciąż wie-

le aspektów tego problemu jest niewyjaśnionych (Gajda i Smorąg, 2009).

W odniesieniu do świń, badania z zakresu kriokonserwacji oocytów są zaawansowane w najniższym stopniu ze względu na specyficzną wrażliwość gamet i zarodków tego gatunku na schładzanie i kriokonserwację. W badaniach nad wrażliwością oocytów świni na niskie temperatury stwierdzono, że komórki wzgórka jajonośnego otaczające niedojrzały oocyt nie przeżywają oziębiania już do temperatury +15°C (Didion i in., 1990). Negatywny wpływ niskich temperatur, manifestujący się depolimeryzacją cytoszkieletu jest związany prawdopodobnie z penetracją związków osłaniających do komórki oocytu (Vincent i in., 1989), a także z procesami związanymi z ochładzaniem zawartych w cytoplazmie lipidów, które mogą wpływać destrukcyjnie na strukturę cytoszkieletu (Liebermann i in., 2002). Ta druga hipoteza została potwierdzona w badaniach przeprowadzonych na oocytach świeżych, poddawanych wirowaniu (Liebermann i in., 2002). Stwierdzono mianowicie, że po 48-godzinnej hodowli w oocytach wirowanych następował powrót lipidów do ich pierwotnego stanu w cytoplazmie. W oocytach mrożonych poddanych wirowaniu procesy te były natomiast nieodwracalne. Dowodzi to, według autorów powyższych badań, wpływu procesu kriokonserwacji na fizykochemiczne zmiany lipidów obecnych w cytoplazmie oocytów (Liebermann i in., 2002).

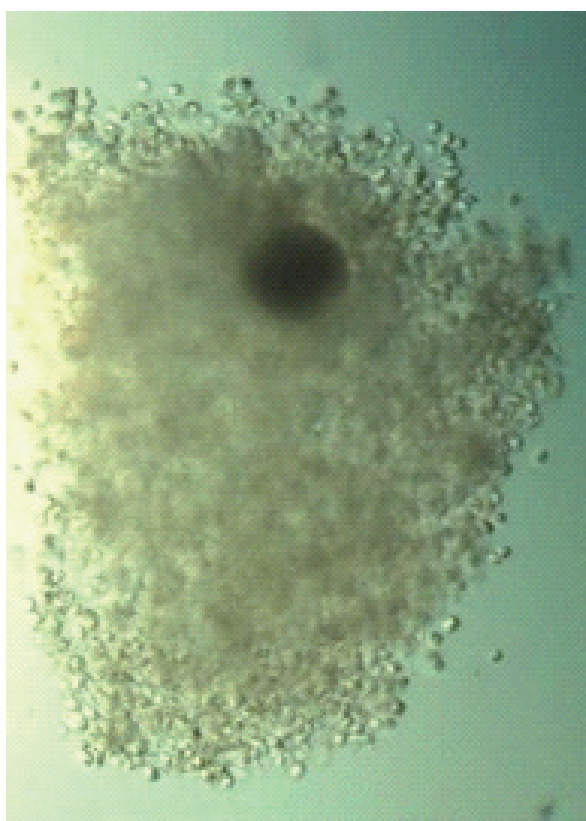
W kolejnych badaniach stwierdzono większą podatność na kriokonserwację dojrzałych oocytów świni w stadium metafazy II (ryc. 1) niż oocytów niedojrzałych (Rojas i in., 2004). Nasuwa się pytanie, czy istnieje jakaś różnica we

¹Praca wykonana w ramach projektu „Kierunki wykorzystania oraz ochrona zasobów genetycznych zwierząt gospodarskich w warunkach zrównoważonego rozwoju” współfinansowanego przez Narodowe Centrum Badań i Rozwoju w ramach Strategicznego programu badań naukowych i prac rozwojowych „Środowisko naturalne, rolnictwo i leśnictwo” – BIOSTRATEG, nr umowy: BIOSTRATEG2/297267/14/NCBR/2016.

właściwościach elementów cytoszkieletu pomiędzy tymi dwoma stadiami oocyty? Jedną z głównych różnic wykazanych między stadiem GV a metafazą II oocyty jest konfiguracja mikrotubul i mikrofilamentów (Allworth i Albertini, 1993). Jeśli założymy, że interakcja między fazą lipidową komórek i elementami cytoszkieletu jest złożona, utwardzanie lipidów może być przyczyną deformacji i zniszczenia elementów cytoszkieletu. W tej sytuacji sztywny cytoszkielet GV-oocytów to prawdopodobnie skutek całkowitego uszkodze-

nia, podczas gdy w bardziej elastycznym cytoszkiecie oocytów dojrzałych nie występują stałe uszkodzenia.

Stąd też, w badaniach dotyczących witrifikacji oocytów niedojrzałych stosowano cytochalazynę B jako inhibitor polimeryzacji mikrofilamentów aktynowych (Isachenko i in., 1998; Fujihira i in., 2004), która specyficznie oddziałuje na elementy cytoszkieletu, wpływając na jego elastyczność, jak również większą wrażliwość lipidów na ochładzanie (Casella i in., 1981).

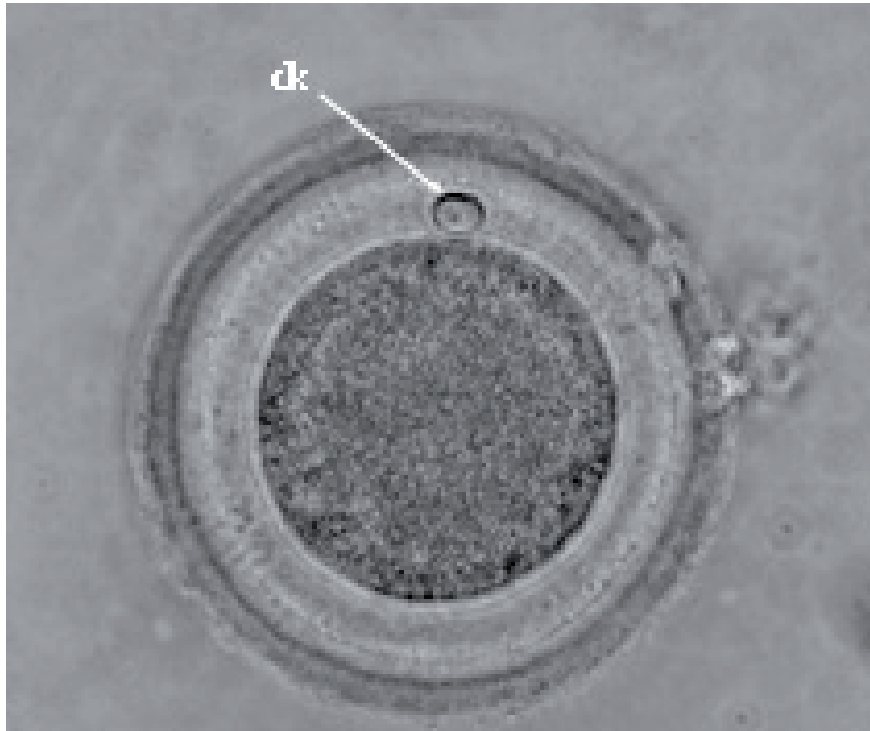


Ryc. 1. Dojrzały oocyt świni w stadium metafazy II otoczony rozproszoną warstwą komórek wzgórka jajonośnego (fot. I. Mandryk)

Fig. 1. Mature porcine oocyte at the metaphase II stage with cumulus cells (phot. I. Mandryk)

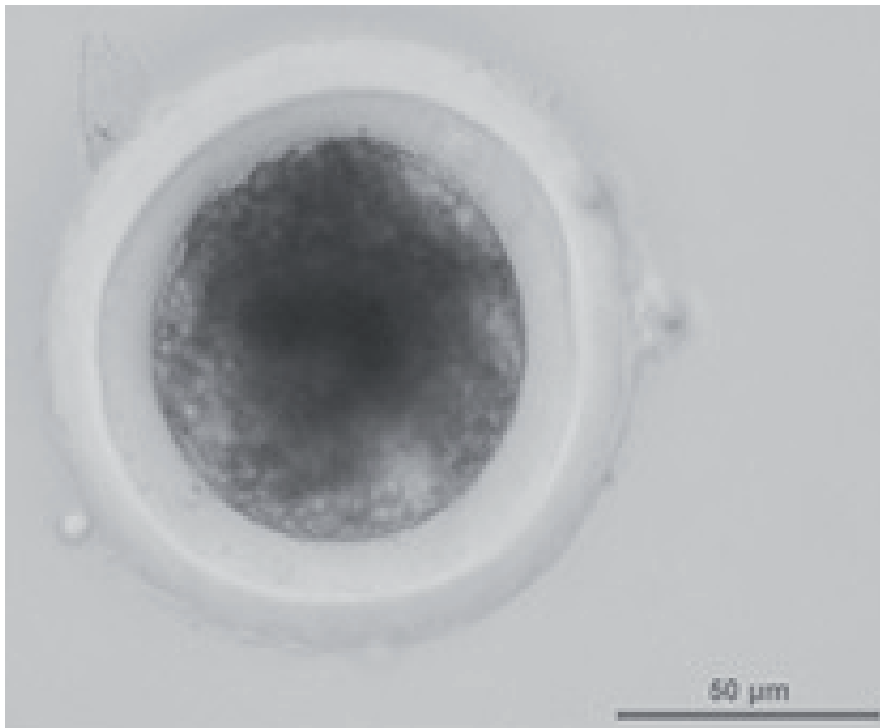
Jak już wspomniano wyżej, cytoszkielet oocytów, a szczególnie mikrotubule są w znacznym stopniu uszkodzane w procesie kriokonserwacji, co prowadzi do zaburzeń w transporcie oraz przestrzennym uporządkowaniu różnorodnych biomolekuł i organelli (Vincent i Johnson, 1992). Jest to widoczne zwłaszcza na przykładzie mitochondriów w świeżych, dojrzałych oocytach

świni, które są równomiernie rozmieszczone w cytoplazmie, a po kriokonserwacji ich rozmieszczenie ulega zmianie poprzez tworzenie agregatów (Fu i in., 2009). Jest to zjawisko niekorzystne, gdyż wiąże się z obniżeniem potencjału błony mitochondrialnej oraz z występowaniem nieprawidłowości w utrzymaniu homeostazy jonów wapnia, jak również zaburzeniami w regulacji produkcji ATP.



Ryc. 2. Dojrzały oocyt świni po usunięciu komórek wzgórka jajonośnego z widocznym I ciałkiem kierunkowym (ck) (fot. L. Kątska-Książkiewicz)

Fig. 2. Mature porcine oocyte after denuding from cumulus cells with one polar body (ck) (phot. L. Kątska-Książkiewicz)



Ryc. 3. Witryfikowany dojrzały oocyt świni (fot. B. Gajda)

Fig. 3. Vitrified mature porcine oocyte (phot. B. Gajda)

Z doświadczeń nad witryfikacją niedojrzałych oocytów świni w mieszaninie glicerolu i surowicy, traktowanych wcześniej cytochalazyną B wynikało, że po rozmrożeniu 21% oocytów osiągało dojrzałość po ponad czterdziestogodzinnej hodowli *in vitro* (Isachenko i in., 1998). Znacznie wyższy odsetek dojrzałych oocytów (37%) uzyskano po traktowaniu ich cytochalazyną B i witryfikacji przy użyciu glikolu etylenowego jako związku osłaniającego oraz nieco niższy (24%) po identycznym traktowaniu i witryfikacji w mieszaninie glikolu etylenowego i dwumetylosulfotlenku (Fujihira i in., 2004). Na uwagę zasługują również próby zastosowania innego stabilizatora cytoszkieletu, jakim jest Taxol (Fujihira i in., 2005; Shi i in., 2006). Stwierdzono, że Taxol zmienia dynamikę mikrotubuli w oocytach ssaków w stadium GVBD (ang. *germinal vesicle break down*), czyli zaniku otoczki jądrowej pęcherzyka zarodkowego (Sun i in., 2001). Odnośnie korzystnego wpływu dodatku Taxolu na kriokonserwację oocytów świni zdania autorów dwóch wcześniej cytowanych prac (Fujihira i in., 2005; Shi i in., 2006) są podzielone. Wydaje się jednak, że zagadnienie to wymaga dalszych badań, szczególnie w kontekście ukazania się doniesienia o korzystnym wpływie Taxolu na morfologię, ultrastrukturę i rozmieszczenie kropli lipidowych oraz mitochondriów w witryfikowanych dojrzałych *in vitro* oocytach świni (Fu i in., 2009).

W badaniach dotyczących kriokonserwacji oocytów świni, poza poszukiwaniem odpowiednich warunków użycia związków osłaniających (Wu i Li, 1996; Liu i in., 2003) podejmowano również próby wykorzystania w procesie kriokonserwacji tzw. substancji antymrożeńowych (Rubinsky i in., 1991; Araw i in., 1993). Zastosowanie tych związków w kriokonserwacji oocytów i zarodków jest przedmiotem badań w ostatnich kilkunastu latach (Harding i in., 2003; Fuller, 2004).

W procesie kriokonserwacji oocytów świni istotnym problemem jest duża zawartość związków lipidowych. W celu rozwiązania tego problemu są stosowane różne strategie redukcji lub usuwania części lipidów, względnie całych kropli lipidowych. Najczęściej były stosowane metody mikrochirurgiczne (Nagashima i in., 1996; Hara i in., 2005) lub mechaniczne z wyko-

rzystaniem wirowania w celu polaryzacji lipidów (Park i in., 2005). Stwierdzono, że oocyty poddane witryfikacji po mikrochirurgicznym usunięciu związków lipidowych mogą być skutecznie zapłodnione *in vitro* i rozwijać się do stadium 8 komórek – moruli (Nagashima i in., 1996). Interesującą metodę usuwania całych kropli lipidowych po wcześniejszym wirowaniu oocytów w hipertonicznym roztworze cukru zastosowali Hara i in. (2005), uzyskując wyższą podatność oocytów świni w stadium GV na kriokonserwację w porównaniu do oocytów nie poddawanych takiemu zabiegowi.

Obecnie badania z zakresu kriokonserwacji oocytów świni koncentrują się głównie na ich witryfikacji (Potdar i in., 2014). W metodzie tej zestalanie płynu odbywa się nie na drodze krystalizacji, jak to ma miejsce w przypadku zamrażania, lecz poprzez bardzo szybki wzrost lepkości w trakcie schładzania. Metoda ta z praktycznego punktu widzenia stanowi duże uproszczenie w stosunku do konwencjonalnych sposobów kriokonserwacji. Głównym problemem witryfikacji nie są już uszkodzenia, będące skutkiem powstawania kryształów wewnątrzkomórkowych, co ma miejsce w przypadku mrożenia, lecz toksyczność związków osłaniających oraz uszkodzenia natury osmotycznej. Wymagana koncentracja związków osłaniających niezbędna do uzyskania witryfikacji jest bowiem znacznie wyższa niż przy mrożeniu i w związku z tym jest słabo tolerowana przez poddawany kriokonserwacji materiał biologiczny. Niemniej jednak, metoda ta pozwala już obecnie na uzyskanie akceptowalnej efektywności w odniesieniu do zarodków mysich, szczurzych, króliczych, owczych, kozich, końskich i bydłych (Gajda i Rajska, 2014). W odniesieniu do oocytów i zarodków świni metoda witryfikacji pozostaje nadal na etapie badań, a jej praktyczne wykorzystanie uwarunkowane jest poprawą efektywności tej technologii (Zhou i Li, 2009).

Kolejny postęp w uzyskiwaniu wyższej skuteczności metod kriokonserwacji oocytów osiągnięto dzięki zastosowaniu nowych rozwiązań technologicznych. Najbardziej znaczące okazały się tutaj: witryfikacja w minimalnej objętości próbki w otwartych cienkich słómkach, tzw. metoda OPS (*open-pulled straw*) (Vajta, 2000) lub SOPS (*small open-pulled straw*) (Vajta

i Kuwayama, 2006), witrifikacja na powierzchni ochłodzonej w ciekłym azocie metalowej kostki pokrytej folią aluminiową, tzw. metoda SSV (*solid surface vitrification*) (Somfai i in., 2006), witrifikacja na cienkiej błonie umieszczonej w specjalnym narzędziu, tzw. „cryotop” (Fujihira i in., 2004) lub witrifikacja z dodatkiem nanocząstek (Li i in., 2016). Metody te przyniosły jednak tylko niewielką poprawę przeżywalności oocytów ssaków, w tym również oocytów świni.

Z innych możliwości prowadzących do podwyższenia efektywności kriokonserwacji oocytów można wymienić próby obniżenia toksyczności związków osłaniających przez zastąpienie ich związkami osmotycznie obojętnymi, np. choliną, czy też zastąpienie albuminy cholesterolem (Horvath i Seidel, 2006). Ostatnie z wymienionych modyfikacji przyniosły jednak stosunkowo niewielki postęp w zakresie kriokonserwacji oocytów ssaków.

Zupełnie innym podejściem, mającym na celu uzyskanie wyższej wydajności kriokonserwacji jest poddawanie materiału biologicznego przed jego kriokonserwacją wysokiemu ciśnieniu hydrostatycznemu. Takie postępowanie powoduje „adaptację” komórek do warunków stresowych, jakim jest kriokonserwacja, co w konsekwencji może powodować zwiększenie jej efektywności. Próby zastosowania tej technologii do kriokonserwacji oocytów świni umożliwiły uzyskanie po rozmrożeniu od 1,5 do 15,5% rozwijających się partenogenetycznie blastocyst w porównaniu do 0,8 do 1,3% w kontroli (Pribenszky i in., 2008). Wydaje się, że metoda z zastosowaniem wysokiego ciśnienia hydrostatycznego stwarza praktyczne możliwości zwiększenia efektywności kriokonserwacji oocytów świni.

W ostatnim czasie próbowano również z powodzeniem wykorzystać stres osmotyczny wywołany ekspozycją oocytów świni przed kriokonserwacją w medium o podwyższonej koncentracji od 593 do 1306 mOsm chlorku sodu (Lin i in., 2009). Uzyskane przez autorów wyniki wykazały znacznie wyższe kompetencje rozwojowe witrifikowanych oocytów poddawanych wcześniej stresowi osmotycznemu (odpowiednio 5 i 16% z traktowanych oocytów rozwinęło się do blastocysty) niż oocytów nie poddawanych działaniu stresu.

W doświadczeniach prowadzonych w Dziale Biotechnologii Rozrodu Zwierząt Instytutu Zootechniki Państwowego Instytutu Badawczego rozwijano technologię kriokonserwacji metodą witrifikacji zarówno niedojrzałych, jak i dojrzałych oocytów świni. Jak już wspomniano wcześniej, wysoka koncentracja lipidów jest przyczyną wyjątkowo dużej wrażliwości oocytów i zarodków świni na kriokonserwację. W przeprowadzonych badaniach (Gajda i Smorąg, 2007), dotyczących oceny stopnia toksyczności mieszaniny witrifikacyjnej składającej się z glikolu etylenowego (GE), dwumetylosulfotlenku (DMSO) i surowicy płodów cielęcych (FCS) na dojrzałe *in vivo* oocyty świni, obserwowano spadek morfologicznie normalnych oocytów uwarunkowany czasem przetrzymywania oocytów w mieszaninie witrifikacyjnej. Przetrzymywanie oocytów w mieszaninie witrifikacyjnej redukowało też znacznie liczbę oocytów dzielących się partenogenetycznie. Użycie do witrifikacji oocytów świni (Gajda i Smorąg, 2008) mieszaniny składającej się z GE+DMSO+FCS pozwoliło na uzyskanie przeżywalności *in vitro* tylko w przypadku oocytów dojrzałych (11 do 19%). Niezależnie od zastosowanej mieszaniny witrifikacyjnej (z dodatkiem surowicy lub bez) partenogenetycznie rozwijały się tylko witrifikowane oocyty dojrzałe *in vivo*.

Badania te potwierdziły stwierdzoną wcześniej większą podatność na kriokonserwację oocytów dojrzałych niż oocytów niedojrzałych (Rojas i in., 2004). W kolejnych badaniach do witrifikacji oocytów świni stosowano otwarte cienkie słomki (OPS) oraz mieszaninę witrifikacyjną składającą się z glikolu etylenowego i dwumetylosulfotlenku bez dodatku białka, co samo w sobie stanowiło ważne *novum* ze względu na aspekty sanitarno-weterynaryjne (Gajda i Smorąg, 2008). Zastosowana metoda kriokonserwacji pozwoliła na uzyskanie nie przekraczającej 20% przeżywalności *in vitro* dojrzałych oocytów. Badania te potwierdziły stwierdzoną wcześniej większą podatność na kriokonserwację oocytów dojrzałych niż oocytów niedojrzałych oraz korzystny wpływ zastosowania medium do witrifikacji bez dodatku białka. Następny etap badań dotyczył oceny przeżywalności kriokonserwowanych oocytów świni *in vivo*.

Tabela 1. Ważniejsze wyniki witrifikacji oocytów świni
 Table 1. The major results of vitrification of porcine oocytes

Modyfikacje witrifikacji <i>Modification of vitrification</i>	Wyniki <i>Results</i>	Autorzy, rok <i>Author, year</i>
Penetrujące krioprotektory: <i>Permeating cryoprotectants:</i> EG + DMSO	M II oocyty/oocytes: 23,6–37,1% Bl po/after ICSI: 13,5–14,3%	Fujihira i in./et al., 2004
Nie penetrujące krioprotektory: <i>Non-premeating cryoprotectants:</i> 0,75 M S + polisacharydy/ <i>polysaccharides</i>	M II oocyty/oocytes: 21%	Huang i in./et al., 2008
SSV	Bl po/after IVF: 3,4–9,5% Bl po/after ICSI: 13,5–14,3% Bl po/after PA: 2,6–5,4%	Fujihira i in./et al., 2004 Somfai i in./et al., 2006 Gupta i in./et al., 2007
Taxol	Zarodki dzielące po <i>Cleaved embryos after</i> PA: 5,6–24,3%	Shi i in./et al., 2006 Fu i in./et al., 2009
Cytochalazyna B <i>Cytochalasin B</i>	M II oocyty/oocytes: 22% Bl po/after ICSI: 13,5–14,3%	Fujihira i in./et al., 2004
Usunięcie lipidów <i>Delipidation</i>	M II oocyty/oocytes: 7–15%	Hara i in./et al., 2005 Park i in./et al., 2005
Ruten czerwony <i>Ruthenium red</i>	M II oocyty/oocytes: 39,4% Bl po/after IVF: 28,6%	Nakagawa i in./et al., 2008
HHP	Zarodki dzielące po <i>Cleaved embryos after</i> PA: 41,7% Bl po/after PA: 13,1%	Du i in./et al., 2008 Pribenszky i in./et al., 2008
OPS	Bl po/after PA: 11–19%	Gajda i/and Smorąg, 2008
Podwyższona koncentracja <i>High osmolality of</i> NaCl (593–1306 mOsm)	Bl: 5–16%	Lin i in./et al., 2009
Cryotop	Oocyty zapłodnione <i>Fertilized oocytes:</i> 29,5%	Galeati i in./et al., 2011
OPS	M II oocyty/oocytes TPT, urodzenie prosiąt/ <i>piglets born</i>	Gajda i in./et al., 2015
Nanocząstki/ <i>Nanoparticles</i> HA	GV oocyty/oocytes: 30,4%	Li i in./et al., 2016

EG – glikol etylenowy, DMSO – dwumetylosulfotlenek, M II oocyt – oocyt dojrzały w stadium metafazy II, Bl – blastocysta, S – sacharoza, SSV – witrifikacja na powierzchni metalowej kostki pokrytej folią aluminiową, ICSI – docytoplazmatyczna iniekcja plemnika, PA – partenogenetyczna aktywacja, HHP – podwyższone ciśnienie hydrostatyczne, OPS – otwarte cienkie słomki, mOsm – miliosmomol, TPT – transfer, HA – hydroksyapatyt.

EG – ethylen glicol, DMSO – dimethylsulfoxide, M II oocyt – mature oocyte in methaphase II stage, Bl – blastocyst, S – sucrose, SSV – solid surface vitrification, ICSI – intracytoplasmic sperm injection, PA – parthenogenetic activation, HHP – high hydrostatic pressure, OPS – open pulled straw, mOsm – milliosmiummole, TPT – transfer, HA – hydroxy apatite.

Do witrifikacji użyto, podobnie jak w przypadku *in vitro*, mieszaniny witrifikacyjnej składającej się z DMSO i GE z dodatkiem lub bez białka. Transfer do jajowodów 4 biorczyń 127 dojrzałych *in vivo* oocytów witrifikowanych metodą OPS w mieszaninie witrifikacyjnej z dodatkiem białka nie doprowadził do uzyskania ciąży. Natomiast, po transferze do 4 biorczyń 112 dojrzałych oocytów witrifikowanych w mieszaninie witrifikacyjnej bez dodatku białka – w 2 przypadkach stwierdzono ciążę (Gajda i Smorąg, 2010 a).

W wyniku oproszenia uzyskano 12 żywych prosiąt, które poddano testom weryfikacji

ich pochodzenia (Gajda i Smorąg, 2010 b). Zostały one przeprowadzone przez współpracujący z Działem Biotechnologii Rozrodu Zwierząt IZ PIB zespół prof. Ryszarda Słomskiego (Katedra Biochemii i Biotechnologii Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu) w oparciu o opisaną w publikacji (Gajda i in., 2015) oryginalną metodę molekularną.

Pozytywny wynik uzyskano w przypadku 4 prosiąt, co oznacza, że uzyskaliśmy pierwsze prosięta w świecie urodzone po przeniesieniu kriokonserwowanych dojrzałych *in vivo* oocytów świni (Gajda i in., 2015).



Ryc. 4. Prosięta urodzone po transferze witrifikowanych oocytów świni (fot. B. Gajda)

Fig. 4. Piglets born after transfer of vitrified pig oocytes (phot. B. Gajda)

Podsumowanie

Reasumując można zauważyć, że z jednej strony związki lipidowe są poważną przeszkodą w procesie kriokonserwacji oocytów, z drugiej strony ich rola w procesach życiowych komórki

jako materiału energetycznego i budulcowego jest bardzo ważna. A zatem, aby opracować efektywną metodę kriokonserwacji oocytów, należy w badaniach wziąć pod uwagę następujące zagadnienia (Liebermann i in., 2002):

- zabezpieczenie schładzanych lipidów przed zmianami ich fizykochemicznych właściwości,
- uniknięcie nieodwracalnych zmian w błonach kropli lipidowych,
- ochronę wiązań siateczka cytoplazmatyczna-lipidy przed zniszczeniem w czasie ochładzania.

Według opinii autora, mimo osiągnięcia przez różne zespoły czasami bardzo wysokich wyników przeżywalności kriokonserwowanych oocytów świni, skuteczność stosowanych dotąd metod, a także ich powtarzalność są wciąż na niezadowalającym poziomie. Wynika to głównie ze specyficznej wrażliwości gamet i zarodków tego gatunku na schładzanie i kriokonserwację. Konieczne są dalsze badania, które doprowadzą do zadowalającej efektywności kriokonserwacji, a uzyskiwane wyniki będą bardziej stabilne i powtarzalne.

Na obecnym etapie rozwoju opisane wyżej metody kriokonserwacji oocytów i zarodków świni mogą być już wykorzystane w programach zachowania bioróżnorodności zwierząt, co zostało włączone do koordynowanego przez Instytut Zootechniki programu BIOSTRATEG 2015 pt. „Kierunki wykorzystania oraz ochrona zasobów genetycznych zwierząt gospodarskich w warunkach zrównoważonego rozwoju”.

Kriokonserwacja oocytów i zarodków

świni, jak to zaznaczono we wstępie, może być również bardzo przydatnym narzędziem, zarówno w badaniach, jak też w praktycznej realizacji przedsięwzięć z zakresu biomedycyny. Technologia ta bowiem poszerza oraz ułatwia realizację wielu zamierzeń z nią związanych. Badania z zakresu ksenotransplantacji oraz przyszłe praktyczne jej wykorzystanie stanowią jeden z możliwych obszarów biomedycyny wykorzystujących kriokonserwację oocytów i zarodków.

Na poziomie uzyskiwania transgenicznych świń dla potrzeb ksenotransplantacji znacznym ułatwieniem organizacyjnym byłoby użycie kriokonserwowanych oocytów jako biorców transfekowanych jąder w klonowaniu somatycznym. Kriokonserwacja oocytów i zarodków pochodzących od scharakteryzowanych oraz wykazujących właściwą ekspresję osobników będzie optymalnym sposobem ich wykorzystania dla potrzeb ksenotransplantacji.

Z opisanych powyżej powodów kriokonserwacja oocytów i zarodków świń, a także innych gatunków zwierząt może znaleźć zastosowanie podczas uzyskiwania i wykorzystywania zwierząt jako modeli do badań mechanizmów powstawania chorób człowieka czy oceny skuteczności nowych farmaceutyków. Można odnieść to zarówno do zwierząt nie modyfikowanych, jak też zwierząt modyfikowanych genetycznie (transgenicznych).

Literatura

- Allworth A.E., Albertini D.F. (1993). Meiotic maturation in cultured bovine oocytes is accompanied by remodeling of the cumulus cell cytoskeleton. *Dev. Biol.*, 158: 101–112.
- Araw A., Rubinsky B., Fletcher G., Seren E. (1993). Cryogenic protection of oocytes with antifreeze proteins. *Mol. Reprod. Dev.*, 36: 488–493.
- Casella J., Flanagan M., Lin S. (1981). Cytochalasin B inhibits actin polymerization and induces depolymerization of actin filaments formed during platelet shape change. *Nature*, 293: 302–305.
- Didion B.A., Pomp D., Martin M.J., Homanics G.E., Markert C.L. (1990). Observation on the cooling and cryopreservation of pig oocytes at the germinal vesicle stage. *J. Anim. Sci.*, 68: 2803–2810.
- Du Y., Pribenszky Cs., Molnar M., Zhang X., Yang H., Kuwayama M., Pedersen A.M., Villemoes K., Bolund L., Vajta G. (2008). High hydrostatic pressure: a new way to improve *in vitro* developmental competence of porcine matured oocytes after vitrification. *Reproduction*, 135: 13–17.
- Fu X.W., Shi W.Q., Zhang Q.J., Zhao X.M., Yan C.L., Hou Y.P., Zhou G.B., Fan Z.Q., Suo L., Zhu S.E. (2009). Positive effects of Taxol pretreatment on morphology, distribution of ultrastructure of mitochondria and lipid droplets in vitrification of *in vitro* matured porcine oocytes. *Anim. Reprod. Sci.*, 115: 158–168.
- Fujihira T., Kishida R., Fukui Y. (2004). Developmental capacity of vitrified immature porcine oocytes following ICSI: effects of cytochalasin B and cryoprotectants. *Cryobiology*, 49: 286–290.

- Fujihira T., Nagai H., Fukui Y. (2005). Relationship between equilibration times and the presence of cumulus cells, and effect of taxol treatment for vitrification of *in vitro* matured porcine oocytes. *Cryobiology*, 51: 339–343.
- Fuller B.J. (2004). Cryoprotectants: The essential antifreezes to protect life in the frozen state. *CryoLett.*, 25: 375–388.
- Gajda B., Rajska I. (2014). Aktualny stan i możliwości kriokonserwacji zarodków i oocytów zwierząt gospodarskich. *Rocz. Nauk. PTZ*, 10, 4: 89–111.
- Gajda B., Skrzypczak-Zielińska M., Gawrońska B., Słomski R., Smorąg Z. (2015). Successful production of piglets derived from mature oocytes vitrified using OPS method. *CryoLett.*, 36, 1: 8–18.
- Gajda B., Smorąg Z. (2007). Toksyczne oddziaływanie DMSO i glikolu etylenowego na oocyty świni. *Mat. III Krajowego Kongresu Biotechnologii*, Poznań, 9–12.09.2007, 4/5, 106 pp.
- Gajda B., Smorąg Z. (2008). Cryopreservation of *in vivo* matured pig oocytes by OPS vitrification. *Acta Biol. Cracov.*, 50, Suppl. 1, 47 pp.
- Gajda B., Smorąg Z. (2009). Oocyte and embryo cryopreservation – state of art and recent developments in domestic animals. *J. Anim. Feed Sci.*, 18: 371–387.
- Gajda B., Smorąg Z. (2010 a). Pregnancy after transfer of pig matured oocytes vitrified using ops method. *Mat. Konf. TBR: Centralne i Lokalne Regulacje Procesów Rozrodczych*, Zakopane 17–19.02.2010, 21 ss.
- Gajda B., Smorąg Z. (2010 b). Normal piglets born after transfer of pig matured oocytes vitrified using ops method. *Proc. 26th AETE Conference*, 10–11.09.2010, Kuopio, Finland, 152 pp.
- Galeati G., Spinaci M., Vallorani C., Bucci D., Porcu E., Tamanini C. (2011). Pig oocyte vitrification by cryotop method: Effects on viability, spindle and chromosome configuration and *in vitro* fertilization. *Anim. Reprod. Sci.*, 127: 43–49.
- Gupta M.K., Uhm S.J., Lee H.T. (2007). Cryopreservation of immature and *in vitro* matured porcine oocytes by solid surface vitrification. *Theriogenology*, 67: 238–248.
- Hara K., Abe Y., Kumada N., Aono N., Kobayashi J., Matsumoto H., Sasada H., Sato E. (2005). Extrusion and removal of lipid from the cytoplasm of porcine oocytes at the germinal vesicle stage: Centrifugation under hypertonic conditions influences vitrification. *Cryobiology*, 50: 216–222.
- Harding M.M., Anderberg P.I., Haymet A.D.J. (2003). Antifreeze glycoproteins from polar fish. *Eur. J. Biochem.*, 270: 1381–1392.
- Horvath G., Seidel G.E. Jr. (2006). Vitrification of bovine oocytes after treatment with cholesterol-loaded methyl-beta-cyclodextrin. *Theriogenology*, 66: 1026–1033.
- Huang J., Li Q., Zhao R., Li W., Han Z., Chen X., Hiao B., Wu S., Jiang Z., Hu J. i in. (2008). Effect of sugar on maturation rate of vitrified-thawed immature porcine oocytes. *Anim. Reprod. Sci.*, 106: 25–35.
- Isachenko V., Perez-Sanchez F., Isachenko E., Grishchenko V., Soler C. (1998). Vitrification of GV porcine oocytes with intact intracellular lipids: effect of the cryoprotectant saturation/dilution stepping, elevated temperature and cytoskeletal inhibitor. *Cryobiology*, 36: 250–253.
- Li W.J., Zhou X.L., Liu B.L., Dai J.J., Song P., Teng Y. (2016). Effect of nanoparticles on the survival and development of vitrified porcine GV oocytes. *CryoLett.*, 37 (6): 401–405.
- Liebermann J., Nawroth F., Isachenko V., Isachenko E., Rahimi G., Tucker M.J. (2002). Potential importance of vitrification in reproductive medicine. *Biol. Reprod.*, 67: 1671–1680.
- Lin L., Kragh P.M., Purup S., Kuwayama M., Du Y., Zhang X., Yang H., Bolund L., Callesen H., Vajta G. (2009). Osmotic stress induced by sodium chloride, sucrose or trehalose improves cryotolerance and developmental competence of porcine oocytes. *Reprod. Fert. Dev.*, 21, 2: 338–344.
- Liu R.H., Sun Q.Y., Jiao L.H., Wang W.H. (2003). Maturation of porcine oocytes after cooling at the germinal vesicle stage. *Zygote*, 11: 299–305.
- Nagashima H., Kuwayama M., Gruppen C.G., Ashman R.J., Nottle M.B. (1996). Vitrification of porcine early cleavage stage embryos and oocyte after removal of cytoplasmic lipid droplets. *Theriogenology*, 45, 180 pp.
- Nakagawa S., Yoneda A., Hayakawa K., Watanabe T. (2008). Improvement in the *in vitro* maturation rate of

- porcine oocytes vitrified at the germinal vesicle stage by treatment with a mitochondrial permeability transition inhibitor. *Cryobiology*, 57, 3: 269–275.
- Park K.E., Kwon I.K., Han M.S., Niwa K. (2005). Effects of partial removal of cytoplasmic lipid on survival of vitrified germinal vesicle stage pig oocytes. *J. Reprod. Dev.*, 51, 1: 151–160.
- Pribenszky Cs., Du Y., Molnar M., Harnos A., Vajta G. (2008). Increased stress tolerance of matured pig oocytes after high hydrostatic pressure treatment. *Anim. Reprod. Sci.*, 106: 200–207.
- Potdar N., Gelbaya T., Nardo L.G. (2014). Oocyte vitrification in 21st century and post-warming fertility outcomes: a systematic review and meta-analysis. *Reprod. Biomed. Online*, 29: 159–176.
- Rojas C., Palomo M.J., Albarracin J.L., Mogas T. (2004). Vitrification of immature and *in vitro* matured pig oocytes: study of distribution of chromosomes, microtubules, and actin microfilaments. *Cryobiology*, 49: 211–220.
- Rubinsky B., Araw A., Vries A.L. de (1991). Cryopreservation of oocytes using directional cooling and antifreeze glycoproteins. *CryoLett.*, 12: 93–106.
- Shi W.Q., Zhu S.E., Zhang D., Wang W.H., Tang G.L., Hou Y.P., Tian S.J. (2006). Improved development by Taxol pretreatment after vitrification of *in vitro* matured porcine oocytes. *Reproduction*, 131: 795–804.
- Somfai T., Dinnyes A., Sage D., Marosan M., Camwath J.W., Ozawa M., Kikuchi K., Niemann H. (2006). Development to the blastocyst stage of parthenogenetically activated *in vitro* matured porcine oocytes after solid surface vitrification (SSV). *Theriogenology*, 66: 415–422.
- Sun Q.Y., Lai L., Wu G.M., Park K.W., Day B.N., Prather R.S., Schatten H. (2001). Microtubule assembly after treatment of pig oocytes with taxol: correlation with chromosomes, gamma tubulin, and MAP kinase. *Mol. Reprod. Dev.*, 60: 481–490.
- Vajta G. (2000). Vitrification of the oocytes and embryos of domestic animals. *Anim. Reprod. Sci.*, 60: 357–364.
- Vajta G., Kuwayama M. (2006). Improving cryopreservation system. *Theriogenology*, 65: 236–244.
- Vincent C., Johnson M.H. (1992). Cooling, cryoprotectants, and the cytoskeleton of the mammalian oocyte. *Oxford Rev. Reprod. Biol.*, 14: 73–100.
- Vincent C., Garnier V., Heyman Y., Renard J.P. (1989). Solvent effects on cytoskeletal organization and *in vivo* survival after freezing of rabbit oocytes. *J. Reprod. Fertil.*, 87: 809–820.
- Wu M.C., Lee H.M. (1996). Vitrification of porcine oocytes. *J. Chin. Soc. Anim. Sci.*, 25: 35–51.
- Zhou G.-B., Li N. (2009). Cryopreservation of porcine oocytes: recent advances. *Mol. Hum. Reprod.*, 15, 5: 279–285.

CURRENT STATUS AND THE POSSIBILITIES OF CRYOPRESERVATION OF PIG OOCYTES

Summary

The paper presents the current possibilities, state of knowledge and prospects of cryopreservation of pig oocytes. The main factors of cryopreservation efficiency, methods of cryopreservation of pig oocytes and the possibilities of modifying their susceptibility to cryopreservation are discussed. Porcine oocytes characteristically contain large amounts of cytoplasmic lipids that are major obstacles limiting efficient cryopreservation. Vitrification is widely used for cryopreservation of pig oocytes. Modified vitrification technologies such as solid-surface vitrification, cryotop, open-pulled straw and small open-pulled straw system have been used to cryopreserve porcine oocytes. The most significant results of pig oocytes vitrification and various oocyte vitrification system of this method are presented.

Key words: pig, oocyte, cryopreservation, vitrification