

życia płciowego. Taki wynik pozwala na wyjaśnienie przyczyn obniżenia płodności buhajów pochodzących z ciąży bliźniaczych różnopłciowych [17].

Literatura: 1. Bugno M., Klukowska-Rötzler J., Słota E., Witarski W., Gerber V., Leeb T., 2007 – Fluorescent in situ hybridization mapping of the epidermal growth factor receptor gene in donkey. *J. Anim. Breed. Genet.* 124 (w druku). 2. Bugno M., Słota E., Kościelny M., 2007 – Karyotype evaluation among young horse populations in Poland. *Schweizer Archiv für Tierheilkunde* 5 (w druku). 3. Bugno M., Słota E., Pieńkowska-Schelling A., Schelling C., 2007 – *Acta Vet. Hung.* 55, 2, 207-212. 4. Bugno M., Słota E., Pieńkowska-Schelling A., Schelling C., 2005 – *Rocz. Nauk. Zoot.* 32, 1, 11-17. 5. Bugno M., Słota E., Tischner M. (Jr), Tischner M., 2003 – *Ann. Anim. Sci.* 3, 2, 207-212. 6. Bugno M., Słota E., Wieczorek M., Yang F., Buczyński J., Świtoński M., 2003 – *Equine Vet. J.* 35, 2, 109-110. 7. Bugno M., Słota E., Ząbek T., 2001 – *Ann. Anim. Sci.* 1, 2, 5-9. 8. Bugno M., Słota E., 2007 – *Acta Vet. Hung.* 55, 3 (w druku). 9. Danielak-Czech B., Słota E., Bugno M., Pieńkowska-Schelling A., Schelling C., 2006 – *Ann. Anim. Sci.* 6, 219-224. 10. Fu Y-H., Kuhl D.P.A., Pizzutti A., Pieretti M., Richards S., Verkerk A.J.M.H., Warren S.T., Oostra B.A., Nelson D.L., Caskey C.T., 1991 – *Cell* 67, 1047-1058. 11. Klukowska-Rötzler J., Bugno M., Sander P., Słota E., Dolf G., Chowdhary B.P., Leeb T., Gerber V., 2006 – *Hereditas* 143, 138-141. 12. Klukowska-Rötzler J., Bugno M., Słota E., Robinson E., Plum F., Gu-

erin G., Dolf G., Gerber V., 2005 – *Anim. Genet.* 36, 6, 517-519. 13. Kozubska-Sobocińska A., Słota E., Pieńkowska A., 2003 – *Med. Wet.* 59, 987-989, 2003. 14. Kozubska-Sobocińska A., Słota E., Pieńkowska-Schelling A., Schelling C., 2005 – *Ann. Anim. Sci.* 5, 1, 5-9. 15. Rejduch B., Kozubska-Sobocińska A., Radko A., Rychlik T., Słota E., 2004 – *J. Anim. Breed. Genet.* 121, 197-203. 16. Rejduch B., Kozubska-Sobocińska A., Słota E., 2005 – *Rocz. Nauk. Zoot.* 32, 1, 5-9. 17. Rejduch B., 2001 – *Rocz. Nauk. Zoot. Monografie i Rozprawy*, 1-62. 18. Rychlik T., Kozubska-Sobocińska A., Rejduch B., Sikora J., 2005 – *Vet. Med. Czech.* 50, (7), 311-314. 19. Słota E., Rejduch B., Kozubska-Sobocińska A., Żyga A., Natonek M., 2001 – *Anim. Sci. Pap. Rep.* 19, 3, 203-208. 20. Słota E., Kozubska-Sobocińska A., Kościelny M., Danielak-Czech B., Rejduch B., 2003 – *J. Appl. Genet.* 44, 379-382. 21. Słota E., Wnuk M., Bugno M., Pieńkowska-Schelling A., Schelling C., Bratuś A., Kotyla Z., 2007 – *J. Anim. Breed. Genet.* 124, 1-9. 22. Świtoński M., 1992 – *Mat. Konf. XI Zjazdu PTG „Genetyka 2000”*, 13-18. Kraków, 1992. 23. Troyer D.L., Goad D.W., Xie H., Rohrer G.A., Alexander L.J., Beattie C.W., 1994 – *Cytogenet. Cell Genet.* 67, 199-204. 24. Wittenberger M.D., Hagerman R.J., Sherman S.L., McConckie-Rosell A., Welt C.K., Rebar R.W., Corrigan E.C., Simpson J.L., Nelson L.M., 2007 – *Fertil. Steril.* 87, 456-465. 25. Ząbek T., Bugno M., Klukowska-Rötzler J., Uhlmann B., Gerber V., Słota E., 2007 – Assignment of five equine genes responsible for development of skeletal and neural system. *Anim. Genet.* (w druku).

Aktualny stan i znaczenie metod kriokonserwacji oocytów i zarodków świni

Barbara Gajda, Zdzisław Smorąg

Niektóre z biotechnologicznych metod rozrodu świń są już obecnie elementem fermowej hodowli trzody chlewnej. Właściwy postępek hodowlany, a także dobry wynik ekonomiczny hodowli świń nie jest bowiem możliwy bez uzyskania zadowalającego poziomu rozrodczości. Wydajne technologie konserwacji zarodków poszerzyłyby możliwość osiągnięcia tego celu. Opracowanie efektywnych metod kriokonserwacji zarodków świń stworzyłoby dogodne warunki międzynarodowego obrotu zarodkami, eliminując wiele problemów, np. związanych z eksportem i importem zwierząt. Ponadto, 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. Dysponowanie materiałem kriokonserwowanym byłoby w tej sytuacji dużym ułatwieniem organizacyjnym.

Jednym z ważnych kierunków wykorzystania kriokonserwacji oocytów i zarodków jest użycie tej metody w programach zachowania bioróżnorodności zwierząt. Technologia ta może być zastosowana jako metoda pomocnicza w utrzymywaniu populacji chronionych żyjących na wolności, do rekonstrukcji ras w przypadku ich zanikania lub istotnej redukcji liczby zwierząt danej rasy oraz do tworzenia nowych linii lub ras.

Kriokonserwacja zarodków

Pomimo znaczących osiągnięć kriobiologii dotyczących konserwacji gamet i zarodków wielu gatunków zwierząt gospodarskich, przez długi czas nie udawało się opanować metod kriokonserwacji

zarodków świni. Przyczyną niepowodzeń okazała się duża wrażliwość zarodków tego gatunku na schładzanie, nawet w zakresie temperatur plusowych [65]. Doświadczenia wykazały, że temperatura, w której następowało zamieranie zarodków mieściła się w granicach od +15 do +10°C [51]. Próby schładzania zarodków świń w obecności związków osłaniających, takich jak DMSO czy glicerol, nie prowadziły do wzrostu ich odporności na niskie temperatury [46]. W kolejnych badaniach wykazano, że podatność zarodków świni na ochładzanie uzależniona jest, w większym stopniu niż to ma miejsce u innych gatunków, od stadium rozwoju zarodka [43]. Stwierdzono między innymi, że istnieje znacząca różnica we wrażliwości na niskie temperatury między wylęglą blastocystą a wcześniejszymi stadiami rozwoju zarodka. W innych badaniach [20, 43] wykazano, że wrażliwość na niskie temperatury zależy od tego czy rozwój zarodka odbywał się *in vitro*, czy *in vivo*. Blastocysty wylęgłe w hodowli *in vitro* są mniej podatne na uszkodzenia w obniżonych temperaturach plusowych niż blastocysty wylęgłe *in vivo* [43]. Specyficzna wrażliwość na niskie temperatury zarodków świni manifestuje się również ich obniżoną podatnością na kriokonserwację.

Czynniki warunkujące podatność na kriokonserwację zarodków świni

Z badań prowadzonych w ciągu ostatnich kilkunastu lat wynika, że głównymi czynnikami warunkującymi podatność zarodków świni na kriokonserwację są: stadium zarodka i jego stan fizjologiczny, wysoka zawartość lipidów, rodzaj użytych związków osłaniających oraz metoda kriokonserwacji.

W początkowych badaniach stwierdzono, że wczesne stadia – od zygoty do moruli i wczesnej blastocysty – nie przeżywają kriokonserwacji [17]. Wszystkie pozytywne rezultaty, jakie zanotowano w kriokonserwacji zarodków świni, osiągnięte zostały wtedy, gdy zarodki znajdowały się w stadiach od ekspandującej do wylęgłej blastocysty [cyt. za 20]. Z badań własnych [17] nad wtryfikacją zarodków świń wynikało, że blastocysty (fot. 1 i 2) przeżywały na poziomie około 30%, podczas gdy nie przeżył żaden zarodek w stadium moruli.

Podatność na kriokonserwację zarodków świni uzależniona jest, jak już wcześniej zaznaczono, także od tego, czy rozwój za-



Fot. 1. Witryfikowana blastocysta świni (fot. B. Gajda)

rodka przebiegał *in vitro* czy *in vivo*. Podwyższona podatność na witrifikację zarodków hodowanych jest zjawiskiem specyficznym dla tego gatunku, gdyż w przypadku innych gatunków bardziej podatne na kriokonserwację są zarodki niehodowane. Przypuszcza się, że podwyższona podatność zarodków świni na kriokonserwację może być wynikiem modyfikacji związków lipidowych, jaka może zachodzić w trakcie hodowli *in vitro*. Niska tolerancja zarodków świni na schładzanie i kriokonserwację jest bowiem rezultatem wysokiej zawartości lipidów, występujących w cytoplazmie wczesnych zarodków tego gatunku [46, 60]. Podczas schładzania zarodków może dochodzić do naruszenia integralności wewnątrzkomórkowych lipidów [10], a w konsekwencji do uszkodzeń cytoplazmy i nieodwracalnych zmian degeneracyjnych zarodka [41]. Badania nad zamrażaniem zarodków 2- i 8-blastomerycznych, z których wcześniej usunięto lipidy na drodze mikrochirurgicznej, doprowadziły do uzyskania blastocyst oraz normalnego potomstwa [42]. Wraz z osiąganiem przez zarodek świni bardziej zaawansowanego stadium rozwoju koncentracja lipidów maleje [47], co stwarza możliwość uzyskania przeżywalności znacznego odsetka kriokonserwowanych zarodków.

Jak już wcześniej wspomniano, badania własne wykazały, że przeżywalność kriokonserwowanych zarodków świni uzyskanych *in vitro* była wyższa niż wyprodukowanych *in vivo*. Pojawia się tutaj pytanie: czy na drodze hodowli *in vitro* jest możliwe zredukowanie zawartości tłuszczu w zarodkach? Częściową odpowiedź powinno dać określenie ilości i rodzaju lipidów występujących zarówno w zarodkach świeżych, jak i hodowanych. Wykonana przez nas wstępna analiza ilościowa zawartości kropli lipidowych w zarodkach, oparta na metodach sterologicznych, wykazała statystycznie istotny spadek zawartości lipidów w zarodkach świeżych od stadium zygoty do blastocysty [56]. Jednak, wbrew oczekiwaniom, spadek zawartości lipidów obserwowany w blastocystach hodowanych był niższy niż w blastocystach niehodowanych [57]. Pozostaje do rozstrzygnięcia, czy i jakie jakościowe zmiany w lipidach zarodkowych, zachodzące w trakcie ich hodowli *in vitro*, mogłyby pozytywnie wpływać na podatność komórek zarodka na kriokonserwację.

Ważnym czynnikiem, decydującym o efektywności kriokonserwacji, jest rodzaj użytego związku osłaniającego. W doświadczeniach nad kriokonserwacją zarodków świni stosowano najczęściej glicerol [26, 33, 45], glicerol z dodatkiem lecytyny [33] lub trehalozę [7]. Obiecującym rozwiązaniem jest użycie glicerolu z dodatkiem żółtka jaja kurzego [12].

W badaniach własnych [14, 16, 17, 19] koncentrowaliśmy się na wykazaniu przydatności glikolu etylenowego, fikolu i sacharozy



Fot. 2. Witryfikowana blastocysta świni po 48-godzinnej hodowli *in vitro* (fot. B. Gajda)

(EFS) lub glikolu etylenowego, fikolu i trehalozy (EFT). Przeżywalność morul przetrzymywanych w mieszaninie EFT była wyższa niż przetrzymywanych w niej blastocyst [14]. Uzyskaliśmy 30-40% przeżywalność morul i blastocyst przetrzymywanych w mieszaninie EFS [14, 17]. Mieszanina ta okazała się jednak bardziej toksyczna dla wylęgłych niż ekspandujących blastocyst, co w konsekwencji miało wpływ również na wyniki witrifikacji [19].

Kriotechniczne aspekty oraz efektywność kriokonserwacji zarodków świni

Pierwsze sukcesy, jakie zanotowano w kriokonserwacji zarodków świni, były głównie rezultatem użycia do zamrażania zarodków w odpowiednim stadium rozwoju, tj. ekspandującej lub wylęgłej blastocysty [cyt. za 15]. W procedurze zamrażania zakładano kontrolowane wolne schładzanie z szybkością 0,3°C/min i użycie glicerolu, jako związku osłaniającego.

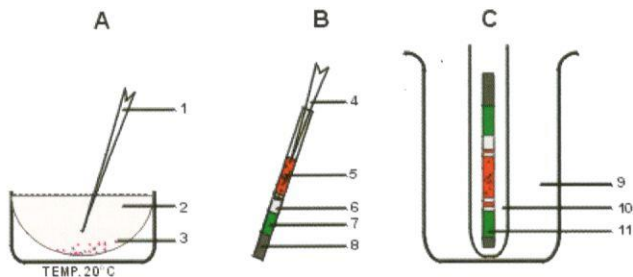
W dotychczasowych badaniach, przeprowadzonych – co należy podkreślić – na niezbyt licznych materiałach, stwierdzono, że dla efektywnego zamrożenia zarodków świni konieczne jest spełnienie kilku podstawowych warunków. Zamrażane winny być blastocysty w stadium bliskim wylęgania. Media stosowane do zamrażania powinny zawierać dodatek albuminy bydlęcej. Jako związku osłaniającego powinno się używać 1,5 M glicerolu, chociaż nie wyklucza się innych związków osłaniających. Procedura zamrażania powinna obejmować wcześniejsze schładzanie zarodków od temperatury pokojowej do temperatury „posiewania” z szybkością wynoszącą 1°C na minutę. Po zainicjowaniu krystalizacji zarodki powinny być zamrażane z szybkością ok. 0,3°C na minutę do temperatury –35 do –38°C przed ich położeniem do ciekłego azotu. Rozmrażanie zarodków powinno się przeprowadzać w łaźni wodnej o temperaturze 35-37°C, przy użyciu 0,3-0,5 M sacharozy. Zastosowanie sacharozy zmniejsza ryzyko wystąpienia uszkodzeń spowodowanych szkodliwym oddziaływaniem związku osłaniającego, w tym również uszkodzeń natury osmotycznej.

W ostatnich latach badania z zakresu kriokonserwacji zarodków świni koncentrują się głównie na ich witrifikacji. W metodzie tej zestalanie płynów odbywa się nie na drodze krystalizacji, ale poprzez bardzo szybki wzrost lepkości w trakcie schładzania. Metoda stanowi duże uproszczenie w stosunku do konwencjonalnych sposobów zamrażania. Głównym problemem witrifikacji jest toksyczność związków osłaniających oraz uszkodzenia natury osmotycznej. Koncentracja związków osłaniających niezbędna do uzyskania witrifikacji jest stosunkowo wysoka i dlatego nie jest tolerowana przez większość materiałów biologicznych. Niemniej jednak metoda witrifikacji pozwala już obecnie na uzyskanie znacznej efektywności w odniesieniu do zarodków mysich, szczurzych, króli-

czych, owczych, kozich, końskich i bydłych [15]. W odniesieniu do zarodków świni metoda ta pozostaje nadal na etapie badań [20].

W metodzie wityfikacji można wyróżnić kilka następujących po sobie etapów, które przedstawiono na rysunkach 1 i 2. Obejmują one ekwilibrację zarodków w mieszaninie związków osłaniających, umieszczenie zarodków w słomkach, schładzanie i przechowywanie słomek z zarodkami w kontenerze z ciekłym azotem, a następnie rozmrażanie słomek, które odbywa się w łaźni wodnej o temperaturze ok. 20°C i usuwanie związków osłaniających za pomocą roztworu cukru.

Znaczący postęp w metodzie wityfikacji został osiągnięty dzięki minimalizacji objętości płynu zawierającego wityfikowany zarodek, tzw. „metoda OPS” lub „SOPS” [61]. Takie postępowanie, pozwalające na uzyskanie wysokiego tempa schładzania w trakcie procesu wityfikacji, umożliwiło, w odniesieniu do zarodków świni, osiągnięcie stosunkowo wysokiej przeżywalności *in vitro* (morula – 14 do 70%, blastocysta – 67 do 73%) [5, 61] oraz *in vivo* (morula – 13%, blastocysta – 55%) [5, 6]. Przeprowadzone badania własne potwierdziły pozytywny wpływ zminimalizowanej objętości wityfikowanej próbki na przeżywalność zarodków świni w stadium moruli i blastocysty [18, 24].



A – ekwilibracja: 1 – mikropipeta, 2 – mieszanina ekwilibracyjna, 3 – zarodki
 B – przenoszenie zarodków do słomki: 4 – mikropipeta, 5 – zarodki w mieszaninie wityfikacyjnej, 6 – bańka powietrza, 7 – sacharoza, 8 – korek
 C – schładzanie słomki w ciekłym azocie: 9 – pojemnik z azotem, 10 – osłonka, 11 – słomka

Rys. 1. Schemat wityfikacji

Stosowane ostatnio modyfikacje metody wityfikacji, wykorzystujące wysokie tempo schładzania, to m.in. metoda kropłowa zastosowana do oocytów [48] i zarodków bydłych [54], pętłkowa (cryoloop container-less) używana z powodzeniem do zarodków chomika [34] i człowieka [35], czy też metoda z zastosowaniem siateczki mikroskopowej (EM grids) [49], czy schłodzonym poniżej -200°C ciekłym azotem [3] lub urządzeniem Vitmaster z azotem o temperaturze -204°C [2]. Metody te, chociaż wydają się być dość atrakcyjne, są jednak wykorzystywane do kriokonserwacji zarodków świni w bardzo ograniczonym zakresie.

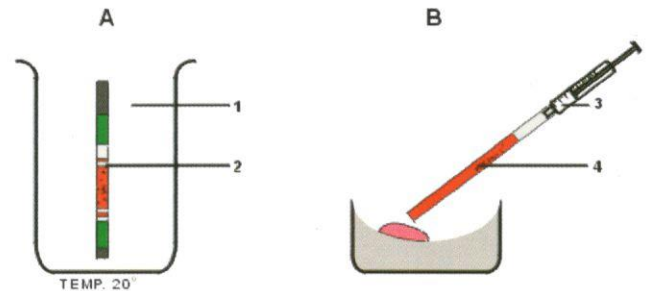
Ocena kriokonserwowanych zarodków

Zarodki świni po rozmrożeniu i usunięciu związków osłaniających poddaje się ocenie morfologicznej, a następnie ocenie na podstawie zdolności do dalszego rozwoju *in vitro* lub *in vivo*, po przeniesieniu do dróg rodnych zsynchronizowanych biorczyń.

Hodowla *in vitro*

Hodowla *in vitro* jest podstawową metodą stosowaną do oceny przeżywalności zarodków po rozmrożeniu lub wityfikacji. Zatem

zapewnienie optymalnych warunków hodowli *in vitro* jest istotnym czynnikiem wpływającym na wiarygodność oceny. Warunki takie spełniają obecnie różne systemy [15]. Zarodki hoduje się w pożywce, w temperaturze 39°C . Najczęściej stosuje się pożywkę o ściśle określonym składzie chemicznym, zawierającą, oprócz soli i białka, związki energetyczne, takie jak: glukoza, mleczan wapnia, pirogronian czy aminokwasy [15]. Jedną z najpopularniejszych i zapewniających najbardziej optymalne warunki jest pożywka NCSU-23 [21, 52]. Hodowlę zarodków przeprowadza się w atmosferze 5% CO_2 w powietrzu lub w mieszance gazowej



A – umieszczenie słomki w łaźni wodnej: 1 – łaźnia wodna, 2 – słomka
 B – wypychanie zawartości słomki do szklanego naczynia: 3 – strzykawka, 4 – słomka z zarodkami

Rys. 2. Schemat rozmrażania

o składzie: 5% CO_2 , 5% O_2 i 90% N_2 . Czas hodowli uzależniony jest od stadium rozwoju rozmrożonego zarodka. Kryterium przeżywalności zarodka stanowi jego dalszy rozwój w warunkach *in vitro* do stadium wylęgającej się lub wylętej blastocysty.

Transplantacja do biorczyń

Pełny rozwój kriokonserwowanych zarodków jest oceniany na podstawie rozwoju *in vivo*, po przeniesieniu do dróg rodnych zsynchronizowanych biorczyń. Można tego dokonać metodą chirurgiczną lub niechirurgiczną.

Transplantacja chirurgiczna. Większość zabiegów transplan-

tacji u świń przeprowadzanych jest chirurgicznie z zastosowaniem laparotomii klasycznej [29] lub minilaparotomii [30]. Zabieg wykonuje się w znieczuleniu ogólnym i miejscowym, na zwierzęciu ułożonym na stole operacyjnym, na grzbiecie. Po przygotowaniu pola operacyjnego wykonuje się cięcie w linii białej o długości ok. 5 cm, od drugiej do trzeciej pary sutek od tyłu. Po przecięciu skóry warstwę mięśni rozdziela się na tępo, przecina otrzewną i otwiera jamę brzuszną. Zarodki przeznaczone do transplantacji poddaje się ocenie pod mikroskopem stereoskopowym, po czym razem z płynem fizjologicznym wciąga do specjalnej rurki za pomocą dołączonej strzykawki Hamiltona. Następnie rurkę z zarodkami wprowadza się poprzez lejek do jajowodu lub macicy i wypycha zarodki za pomocą strzykawki. Liczba wprowadzonych zarodków wynosi najczęściej od ok. 20 do 40.

Zasada, jaką stosuje się powszechnie przy transplantacji zarodków zwierząt, w tym również zarodków świńskich, jest wprowadzanie transplantowanego zarodka w to samo miejsce, skąd zarodek został uzyskany. Praktycznie oznacza to, że zarodki wcześniejszych stadiów rozwojowych, czyli te, które uzyskuje się z jajowodu (od 1 do 8 komórek), wprowadza się do jajowodu, natomiast zarodki późniejszych stadiów rozwojowych, czyli te uzyskane z macicy (stadium moruli do blastocysty), przenosi się do rogu macicy. Opisany sposób postępowania dotyczy zarówno zarodków świeżych, jak i kriokonserwowanych. U świń przynosi on

dobrze rezultaty w przypadku zarodków świeżych. Natomiast w przypadku zarodków kriokonserwowanych, chociaż udaje się uzyskać potomstwo, efektywność zabiegów jest nadal bardzo niska i zróżnicowana. Przypadki uzyskania wyższej efektywności związane były z użyciem np. specjalnej rasy świń o wyjątkowo wysokich zdolnościach implantacyjnych [6, 63]. Generalnie jednak uważa się, że powodem bardzo niskiej efektywności transplantacji zarodków świńskich jest niedoskonałość metody kriokonserwacji zarodków tego gatunku.

W Instytucie Zootechniki zmodyfikowano metodę przenoszenia kriokonserwowanych zarodków świni, co polega na transplantacji wtryfikowanych blastocyst świńskich do jajowodu, zamiast dotychczasowej transplantacji do rogu macicy ([22], wniosek patentowy). Zaletą tej metody jest atraumatyczne wprowadzenie zarodków do jajowodu poprzez lejek jajowodu. Ponadto, „pobyt” kriokonserwowanych zarodków w środowisku jajowodu wydaje się bardzo korzystnie wpływać na ich rozwój i zdolność do implantacji. W wyniku transplantacji 232 wtryfikowanych zarodków do jajowodu 12 biorczyń, ciężę stwierdzono u 7 samic, z których 5 urodziło 29 prosiąt [23]. Były to pierwsze w Polsce prosięta uzyskane po transplantacji kriokonserwowanych zarodków świni (fot. 3).



Fot. 3. Prosięta uzyskane po transplantacji wtryfikowanych zarodków (2003 r.), Ferma Kostkowice (fot. L. Mroczko)

Transplantacja niechirurgiczna. Ze względu na wysoki koszt, czasochłonność, konieczność udziału wykwalifikowanego personelu, ryzyko, jakie niesie znieczulenie ogólne, możliwości wystąpienia powikłań, znaczną traumatyzację tkanek w trakcie zabiegu i konieczny okres gojenia, metody chirurgiczne coraz częściej zastępowane są technikami mniej inwazyjnymi, do których zalicza się metody niechirurgiczne oraz endoskopowe lub laparoskopowe. Głównym utrudnieniem w stosowaniu tych metod u świń są bariery natury anatomicznej: niewielka średnica światła i znaczna grubość oraz pofałdowanie błony śluzowej szyjki macicy, a także długie i poskręcane rogi, utrudniające przeprowadzenie cewników w głąb macicy i jak najgłębsze deponowanie zarodków [cyt. za 64]. Niemniej jednak stosowanych jest kilka różnych przyrządów, opracowanych na bazie kateteru do niechirurgicznego przenoszenia zarodków u bydła [27, 28, 36] lub kateteru stosowanego do macicznego unasieniania świń [39, 40]. Modyfikacje polegają na zastosowaniu dodatkowego kateteru oraz plastikowych słomek [40, 53], czy też dodatkowego czteroczęściowego zestawu umożliwiającego deponowanie zarodków w rogu macicy [36] lub kate-

teru z dołączoną ponad metrowej długości sztywną i elastyczną sondą, zapewniającą swobodne jej przesuwanie wewnątrz dróg rodnych i odpowiednie ułożenie wewnątrz rogu [39]. Podejmowano również próby przenoszenia zarodków z wykorzystaniem endoskopu oraz zmodyfikowanego zestawu do wypłukiwania zarodków [59].

Efektywność niechirurgicznych metod przenoszenia zarodków jest bardzo zróżnicowana i waha się od 6 do 80% [cyt. za 64]. Możliwe jest uzyskanie skuteczności porównywalnej z metodą chirurgiczną. Trzeba jednak zaznaczyć, że większość opisywanych badań wykonana była na niewielkich grupach zwierząt. Biorąc pod uwagę zauważalny postęp w tej dziedzinie, a także wzrastającą presję, wynikającą ze względów zarówno etycznych, jak i ekonomicznych, wydaje się, że opracowanie efektywnej metody niechirurgicznej transplantacji zarodków u świń powinno nastąpić w stosunkowo nieodległej przyszłości.

Kriokonserwacja oocytów

Do tej pory stosunkowo niewiele badań przeprowadzono nad kriokonserwacją oocytów świni. Dotyczy to zarówno oocytów niedojrzałych (stadium GV), jak również oocytów dojrzałych (stadium metafazy II). W badaniach nad wrażliwością oocytów świni na niskie temperatury stwierdzono, że ich negatywny wpływ, manifestujący się m.in. depolimeryzacją cytoszkieletu, związany jest prawdopodobnie z penetracją związków osłaniających do komórki oocytu [50, 62] lub z ochładzaniem zawartych w cytoplazmie lipidów, które skutkuje destrukcją cytoszkieletu [37]. Tę drugą hipotezę zweryfikowano pozytywnie w badaniach przeprowadzonych na oocytach świeżych, poddawanych wirowaniu [37]. Stwierdzono mianowicie, że po 48-godzinnej hodowli w zarodkach wirowanych nastąpiło ponowne rozproszenie lipidów w cytoplazmie. Natomiast w oocytach zamrażanych po wirowaniu proces ten był nieodwracalny, co dowodzi, że istnieje negatywny wpływ kriokonserwacji na fizykochemiczne zmiany lipidów obecnych w cytoplazmie oocytów [37].

Jak już wspomniano, oocyty niedojrzałe są mniej podatne na kriokonserwację niż oocyty dojrzałe [9, 55]. Nasuwa się pytanie dotyczące różnic we właściwościach cytoszkieletu pomiędzy tymi dwoma rodzajami oocytów. Jedną ze stwierdzonych różnic dotyczy konfiguracji mikrotubul i mikrofilamentów [1], na które wpływa utwardzanie lipidów prowadzące do deformacji i zniszczenia elementów cytoszkieletu [31]. „Sztywny” cytoszkielet oocytów w stadium GV, to prawdopodobnie nieodwracalny skutek całkowitego ich uszkodzenia. Cytoszkielet oocytów dojrzałych jest bardziej elastyczny, a jego zmiany nie muszą mieć charakteru stałych uszkodzeń. Zakładając działanie opisanych wyżej mechanizmów, w badaniach dotyczących wtryfikacji oocytów niedojrzałych próbowano stosować cytochalazynę B [11, 31, 32], związek który pozytywnie oddziałuje na elementy cytoszkieletu poprzez zwiększanie jego elastyczności, oraz mniejszą wrażliwość lipidów na oziębianie [8].

Efektywność kriokonserwacji oocytów świni, mimo prób wielu modyfikacji metod, jest wciąż niezadowolająca. W rezultacie wtryfikacji niedojrzałych oocytów w mieszaninie glicerolu i surowicy, tylko 21% rozmrożonych oocytów osiągało dojrzałość *in vitro* [32]. Wyższy odsetek dojrzałych oocytów (37%) uzyskano w wyniku użycia 7,5 µg/ml cytochalazyny B i wtryfikacji w glikolu etylenowym. Podobny rezultat (24%) zanotowano stosując mieszaninę wtryfikacyjną w postaci glikolu etylenowego i dwumetylosulfotlenku [11].

W innych badaniach stwierdzono, że oocyty, w których dokonano mikrochirurgicznego usunięcia lipidów, a następnie wtryfikowano, mogą być skutecznie zapładniane *in vitro* i rozwijać się do stadium 8 komórek – moruli [44]. Usuwanie lipidów z oocytów może być przeprowadzone znacznie prostszą metodą, a miano-

wicie poprzez umieszczanie ich w roztworze hipertonicznym i wirowanie [25].

W badaniach dotyczących kriokonserwacji oocytów świni, poza poszukiwaniem odpowiednich związków osłaniających i warunków ich stosowania [9, 38, 66], próbowano również wykorzystać tzw. substancje antymroźniowe [4, 58], związki izolowane ze zwierząt żyjących w strefie arktycznej. Rezultaty tych badań są jednak niejednoznaczne.

Reasumując, z dotychczasowych badań nad kriokonserwacją oocytów świni wynika, że są one mniej podatne na ten proces niż zarodki. Nie jest to jednak sytuacja wyjątkowa u ssaków, gdyż podobne zjawisko obserwuje się także u innych gatunków. Jednak w przypadku świni efektywność kriokonserwacji zarówno zarodków, jak i oocytów osiąga znacznie niższy poziom niż u pozostałych ssaków.

Praca wykonana w ramach projektu badawczego nr 2 P06D 003 26, realizowanego w latach 2004-2007.

Literatura: 1. Allworth A.E., Albertini D.F., 1993 – Dev. Biol. 158, 101-112. 2. Arav A. et al., 2002 – Mol. Cell. Endocrin. 187, 77-81. 3. Arav A. et al., 2000 – Theriogenology 53, 248. 4. Araw A. et al., 1993 – Mol. Reprod. Dev. 36, 488-493. 5. Berthelot F. et al., 2000 – Cryobiology 41, 116-1124. 6. Berthelot F. et al., 2001 – Reprod. Nutr. Dev. 41, 267-272. 7. Cameron R.D.A. et al., 1992 – Proc. The 12th Intern. Pig Vet. Soc., Hague, The Netherlands, s. 476. 8. Casella J. et al., 1981 – Nature 293, 302-305. 9. Didion B.A. et al., 1990 – J. Anim. Sci. 68, 2803-2810. 10. Edidin M., Petit V.A., 1977 – W: The freezing of mammalian embryos, red. K. Elliott, J. Whelan, Amsterdam, Elsevier, Excerpta Medica, 155-174. 11. Fujihira T. et al., 2004 – Cryobiology 49, 286-290. 12. Fujino Y. et al., 1993 – Cryobiology 30, 299-305. 13. Gajda B., 1998 – Ann. Anim. Sci. 25, 31-38. 14. Gajda B., Smorąg Z., 1994 – Anim. Sci. Pap. Rep. 16, suppl. 1, 59-60. 15. Gajda B., Smorąg Z., 1998 – Biotechnologia 2 (41), 10-32. 16. Gajda B., Smorąg Z., 1999 – Ann. Anim. Sci. 26, 149-154. 17. Gajda B., Smorąg Z., 2000 – Cryo-Lett. 21, 231-236. 18. Gajda B., Smorąg Z., 2001 – Mat. II Zjazd TBR, Warszawa, 5-8.06.2001, P-IV-4. 19. Gajda B., Smorąg Z., 2002 – Cryo-Lett. 23, 385-388. 20. Gajda B., Smorąg Z., 2003 – Biotechnologia 1(60), 138-150. 21. Gajda B., Smorąg Z., 2004 – Ann. Anim. Sci. 4, 315-320. 22. Gajda B. i wsp., 2004 – Medycyna

Wet. 60 (4), 371-373. 23. Gajda B. i wsp., 2005 – Proc. Seventh Int. Conf. on Pig Reproduction, 12-15.06.2005, Kerkrade, Holandia, s. 91. 24. Gajda B. i wsp., 2006 – Acta Biologica Cracoviensia, Botanica 48, suppl. 1, 44, abstr. 25. Hara K. et al., 2005 – Cryobiology 50, 216-222. 26. Hayashi S. et al., 1989 – Vet. Rec. 125, 43-44. 27. Hazeleger W. et al., 1999 – Theriogenology 51, 263. 28. Hazeleger W., Kemp B., 1994 – Reprod. Dom. Anim. 29, 481-487. 29. Hazeleger W., Kemp B., 2001 – Theriogenology 56, 1321-1331. 30. Huang W.T. et al., 2002 – Theriogenology 57, 1533-1537. 31. Isachenko V., 1997 – Probl. Cryobiol. 1-2, 100-110. 32. Isachenko V. et al., 1998 – Cryobiology 36, 250-253. 33. Kameyama K. et al., 1990 – Proc. The 78th Ann. Conf. Jpn. Soc. Anim. Reprod., s. 22 abstr. 34. Lane M. et al., 1999 – Theriogenology 51, 167. 35. Lane M. et al., 1999 – Fertil. Steril. 72, 1073-1078. 36. Li J. et al., 1996 – J. Anim. Sci. 74, 2262-2268. 37. Liebermann J. et al., 2002 – Biol. Reprod. 67, 1671-1680. 38. Liu R.H. et al., 2003 – Zygote 11, 299-305. 39. Martinez E.A. et al., 2004 – Theriogenology 61, 137-146. 40. Martinez E.A. et al., 2001 – Theriogenology 58, 301-311. 41. Mohr I.R., Trounson A.O., 1981 – Biol. Reprod. 25, 1009-1025. 42. Nagashima H. et al., 1995 – Nature 374, 416. 43. Nagashima H. et al., 1988 – Jpn. J. Anim. Reprod. 34, 123-131. 44. Nagashima H. et al., 1996 – Theriogenology 45, 180. 45. Nagashima H. et al., 1992 – Theriogenology 37, 839-850. 46. Niemann H., 1985 – Workshop on Embryos and Oocytes Freezing, Annecy, France, s. 153. 47. Niimura S., Ishida K., 1980 – Jpn. J. Anim. Reprod. 26, 46-49. 48. Papis K. et al., 2000 – Theriogenology 54, 651-658. 49. Park S.P. et al., 2000 – Hum. Reprod. 15, 1787-1790. 50. Pickering S.J., Johnson M.H., 1987 – Hum. Reprod. 2, 207-216. 51. Polge C. et al., 1974 – Cryobiology 11, 560. 52. Reed M.L. et al., 1992 – Theriogenology 37, 95-109. 53. Reichenbach H.D. et al., 1993 – Vet. Rec. 1333, 36-39. 54. Řiha J. et al., 1992 – Živoč. Vyr. 36, 113-119. 55. Rojas C. et al., 2004 – Cryobiology 49, 211-220. 56. Romek M. i wsp., 2005 – Proc. Seventh Int. Conf. on Pig Reproduction, Kerkrade, Holandia, 11-15.06.2005, s. 95. 57. Romek M. i wsp., 2005 – Proc. 14th Int. Symp. „Molecular and Physiological Aspects of Regulatory Processes of the Organism”, Kraków, 2-3.06.2005, s. 404-405. 58. Rubinsky B. et al., 1991 – Cryo-Lett. 12, 93-106. 59. Stein-Stefani J., Holtz W., 1987 – Theriogenology 27, 278. 60. Toner M. et al., 1986 – Biol. Reprod. 34, suppl., 98, abstr. 61. Vajta G. et al., 1997 – Cryo-Lett. 18, 191-195. 62. Vincent C. et al., 1989 – J. Reprod. Fertil. 87, 809-820. 63. White B. et al., 2005 – Proc. Ann. Conf. I.E.T.S., Kopenhaga, Dania, 8-12.01.2005, s. 200. 64. Wieczorek J., 2002 – Życie Wet. 77 (11), 562-566. 65. Wilmut I., 1972 – J. Reprod. Fertil. 31, 513. 66. Wu M.C., Lee H.M., 1996 – J. Chin. Soc. Anim. Sci. 25, 35-51.

Zagadnienia z zakresu żywienia zwierząt i paszoznawstwa w badaniach Instytutu Zootechniki – PIB

Franciszek Brzóska

Tematyka z zakresu żywienia zwierząt i paszoznawstwa realizowana była w Instytucie Zootechniki od momentu jego powstania. Dział Żywienia Zwierząt i Paszoznawstwa, utworzony w 2001 roku, powstał z Zakładu Żywienia Zwierząt i Zakładu Paszoznawstwa. W skład Działu weszli również pracownicy byłego Zakładu Fizjologii Zwierząt.

Zakład Żywienia Zwierząt swoje korzenie ma w Państwowym Instytucie Naukowym Gospodarstwa Wiejskiego (PINGW) w Puławach, który działał w latach 1918-1939. Istniał wówczas Dział Żywienia Zwierząt i Dział Biochemii, których kierownikiem był prof.

dr Henryk Malarski – nestor nauki żywienia zwierząt i twórca pierwszych tabel wartości pokarmowej pasz, a następnie prof. dr Józef Skulmowski. Zakład Paszoznawstwa, utworzony przez prof. dr hab. Adama Wiernego, wywodzi się z Działu Paszowisk Instytutu Zootechniki, przekształconego w Samodzielną Pracownię Użytków Zielonych i Konserwacji Pasz, która kierowana była przez dr. Mieczysława Nowaka (późniejszego profesora SGGW w Warszawie, specjalistę z zakresu łąkarstwa) oraz dr Stanisława Trelę (późniejszego profesora WSR i AR w Krakowie, specjalistę z zakresu konserwacji pasz i żywienia zwierząt).

Dział Żywienia Zwierząt i Paszoznawstwa IZ-PIB zatrudnia 17 pracowników naukowych, w tym: 6 profesorów, 4 docentów i 7 doktorów, a ponadto 3 pracowników inżynierjno-technicznych, 1 technika i 4 osoby na etatach fizycznych. Do Działu przypisane są ponadto 4 osoby wykonujące prace doktorskie. Działowi podlega merytorycznie ferma trzody chlewnej i ferma kurcząt rzeźnych w w Brzeziu oraz ferma kurcząt rzeźnych w Aleksandrowicach. Badania dotyczące bydła prowadzone są w Zakładzie Doświadczalnym Pawłowice oraz w Zakładach Doświadczalnych IZ-PIB – Grodziec Śląski Sp. z o.o i Kołbacz Sp. z o.o. Dział korzysta również z fermy trzody chlewnej w Żernikach Wielkich i Groźcu Śląskim oraz z fermy drobiu w Rossosze. Wyniki badań naukowych pracowników Działu Żywienia i Paszoznawstwa są publikowane, w znacznej mierze, w czasopismach o znaczeniu międzynarodowym. W czasopismach z najwyższej cenionej Listy Filadelfijskiej w ostatnich trzech latach opublikowano około 65 prac nau-