

„Otwarte” metody witrifikacji komórek i ich zastosowanie do kriokonserwacji oocytów i zarodków ssaków

KRZYSZTOF PAPIS

Zakład Embriologii Doświadczalnej Instytutu Genetyki i Hodowli Zwierząt PAN, Jastrzębiec, 05-552 Wólka Kosowska

Papis K.

„Open” vitrification methods and their application in mammalian oocyte and embryo cryopreservation

Summary

Vitrification in its traditional approach turned out to be efficient in cryopreservation of early embryos of many mammalian species including mouse, rabbit, sheep, horse, cattle and recently also human. Moreover, it was successfully employed for cryopreservation of mouse oocytes. However, this traditional approach of vitrification remains inefficient in cryopreservation of more chilling-sensitive cells, such as bovine oocytes and cleavage-stage embryos. Very recently a novel approach of a minimum sample size vitrification system offers a real chance to successfully cryopreserve such sensitive objects. It is believed that a high survival rate of oocytes or embryos vitrified according to this approach is principally due to the impact of much faster cooling and/or warming rates resulting from minimising the volume of the vitrified sample. An additional favourable effect may be achieved by using a novel, specific pre-equilibration and equilibration system prior to vitrification. Because the successful use of minimum sample size vitrification methods usually requires a direct contact of a sample with an appropriate coolant (in most instances - liquid nitrogen) such methods may generally be referred to as an „open vitrification system”. However, despite a high vitrification capability and potential usefulness in many practical applications, an open vitrification system involves the risk of bacterial or viral contamination of cryopreserved cells. In order to avoid this problem, an alternative approach of cooling acceleration (e.g. by using a supercooled liquid nitrogen) is currently under investigation. On the other hand, open vitrification methods still remain relatively inefficient in cryopreservation of certain sensitive objects, such as immature bovine oocytes, for instance, and need to be modified accordingly.

Keywords: vitrification, minimum sample size, oocyte, embryo, pre-equilibration

Witrifikacja (zeszklenie) jest procesem fizycznym prowadzącym do przejścia cieczy w ciało stałe, dzięki zwiększeniu lepkości cieczy w warunkach gwałtownego spadku temperatury. W procesie witrifikacji nie powstają kryształy lodu, które są jednym z podstawowych czynników uszkadzających komórki podczas tradycyjnego zamrażania. Już w latach trzydziestych proponowano wykorzystanie procesu witrifikacji dla celów kriokonserwacji żywych komórek. Jednak trudności techniczne i zbyt wiele niewiadomych dotyczących przebiegu procesu witrifikacji odsunęły praktyczne zastosowanie tej metody o 50 lat. Dopiero w 1985 r. opisano skuteczną procedurę witrifikacji ośmiokomórkowych zarodków myszy (36). W wymienionej pracy zaprezentowano metodę zneutralizowania chemicznej toksyczności wysoko stężonych roztworów witrifikacyjnych poprzez zastosowanie kombinacji kilku środków osłaniających o odmiennych właściwościach chemicznych oraz przeprowadzenie części procedury ekwilibracji w obniżonej temperaturze ($\sim +4^{\circ}\text{C}$).

Wkrótce pojawiły się opisy licznych modyfikacji składu roztworów witrifikacyjnych, zmierzających do ustalenia mieszanin możliwie najmniej toksycznych ale równocześnie zachowujących wysoką zdolność do witrifikacji. Zasadniczym składnikiem wszystkich roztworów witrifikacyjnych jest jeden lub kilka niskocząsteczkowych środków osłaniających, przenikających do wnętrza komórek, jak np. dwumetylosulfotlenek (DMSO), glicerol, glikol etylenowy. Zawartość roztworów uzupełniają zazwyczaj: naturalny lub syntetyczny związek wielkocząsteczkowy np. albumina surowicy bydłowej, glikol polietylenowy lub fikoll oraz – coraz powszechniej – jeden z disacharydów, najczęściej sacharoza (tab. 1).

Klasyczna metoda witrifikacji i jej zastosowanie

Podstawy metodyczne witrifikacji sprowadzają się do krótkotrwałego umieszczenia komórek w roztworze witrifikacyjnym, albo bezpośrednio w roztworze ostatecznym, albo poprzez 1-2 stopniowe rozcieńcze-

Tab. 1. Wybrane przykłady najbardziej znanych roztworów witrifikacyjnych

| Nazwa kompozycji | Skład roztworu | Autor i rok publikacji |
|------------------|---|-------------------------|
| VS1 | DMSO 20,5%, acetamid 15,5%, propandiol 10%, glikol polietylenowy 6% | Rall i Fahy, 1985 |
| Massip's | propandiol 25%, glicerol 25% | Scheffen i Massip, 1986 |
| VS3a | glicerol 6,5 mola, albumina BSA 6%, propandiol 30 (35%), glicerol 30 (35%) | Rall i wsp., 1987 |
| --- | propandiol 30 (35%), glicerol 30 (35%) | Smorąg i wsp., 1989 |
| EFS | glikol etylenowy 40%, Ficoll 18%, sacharoza 0,3 mola | Kasai i wsp., 1990 |
| VM | propandiol 20%, glicerol 10%, sacharoza 1,0 mol | Papis i wsp., 1991 |
| VS14 | glikol etylenowy 5,5 mola, sacharoza 1,0 mol | Ali i Shelton, 1993 |
| --- | DMSO 20%, glikol etylenowy 20%, sacharoza 0,3 mola | Vajta i wsp., 1997 |

nie (ekwilibracja). Następnie, w ślad za techniką wypracowaną dla potrzeb tradycyjnego zamrażania zarodków metodą powolnego, kontrolowanego schładzania, komórki przeznaczone do witrifikacji umieszcza się w małych probówkach lub słomkach inseminacyjnych o pojemności 0,25 ml. Ostatnim etapem postępowania jest zanurzenie słomki lub próbki w ciekłym azocie.

Opisaną powyżej klasyczną metodę witrifikacji zastosowano z powodzeniem do kriokonserwacji zarodków wielu gatunków ssaków, w tym m.in. zarodków myszy (4, 13, 36, 38), królika (14, 30, 31, 39), owcy (1, 8, 42), bydła (23, 25), konia (10) czy świni (7, 17, 47). W 1998 r. opisano po raz pierwszy skuteczne zastosowanie witrifikacji do kriokonserwacji zarodków człowieka (27).

Wkrótce okazało się jednak, że witrifikacja w klasycznej postaci nie przynosi spodziewanych efektów w stosunku do niektórych typów bardziej wrażliwych komórek i zarodków (równie nieskuteczne było w ich przypadku także tradycyjne, kontrolowane zamrażanie). Przykładem komórek bardzo istotnych z praktycznego punktu widzenia są tutaj oocyty i młodsze niż morula zarodki bydła. Pomimo, że począwszy od wczesnych lat 90-tych uzyskiwano niewielki odsetek (2-10%) blastocyst rozwijających się *in vitro* po zapłodnieniu rozmrożonych oocytów (9, 15, 28), a nawet odnotowywano urodzenie cieląt (9), końcowa skuteczność całej procedury pozostawała na bardzo niskim poziomie, wykluczającym jej praktyczne zastosowanie. Jeszcze słabsze rezultaty przynosiły próby kriokonserwacji młodszych, dwu-, trzy- lub czterodniowych zarodków bydła (22).

Otwarte metody witrifikacji – czynniki warunkujące wzrost skuteczności

Przykładem obiektu bardzo wrażliwego na wszelkie próby kriokonserwacji są zarodki muszki owocowej. Właśnie badania nad możliwością witrifikacji zarodków muszki *Drosophila melanogaster* adaptowa-

ne następnie do potrzeb oocytów była przyniosły istotny, długo oczekiwany postęp w kriokonserwacji oocytów i wrażliwych zarodków ssaków. Postęp ten wiąże się z wykorzystaniem znanej od dawna zależności pomiędzy wzrostem dynamiki schładzania próbki a jej podatnością na witrifikację. Tempo zmian temperatury można podnieść m.in. poprzez zmniejszenie objętości próbki. Jednak typowa objętość próbek umieszczanych np. we fragmencie słomki inseminacyjnej jest już i tak bardzo mała. Przykładowo, słup płynu zajmujący 0,5 cm długości słomki o całkowitej objętości 0,25 ml ma objętość około 10 μ l. Radykalne zmniejszenie objętości płynu (od 1 do kilku mikrolitrów), osiągnięto dzięki rezygnacji z tradycyjnego umieszczania próbki w zamkniętym pojemniku, takim jak próbka czy słomka inseminacyjna. Oprócz zmniejszonej objętości próbki, kolejnym czynnikiem decydującym o korzystnej zmianie parametrów witrifikacji stało się uzyskanie bezpośredniego kontaktu próbki z ciekłym azotem (zniknęły ścianki słomki czy próbki izolujące próbkę od źródła zimna). Tempo schładzania płynu zawartego w słonce inseminacyjnej określa się na 2000-2500°C/min. Tymczasem metody „otwarte” pozwalają, w zależności od wariantu na uzyskanie szybkości schładzania w granicach 10-40 tys.°C/min. Analogicznie podnosi się także tempo powrotu próbki do temperatur dodatnich podczas ogrzewania. W opisanych tutaj warunkach roztwory wykazują większą skłonność do zeszklenia, zaś uzyskane szkliwo jest lepszej jakości (trudniej ulega dewitrifikacji podczas ogrzewania). Równocześnie, znacznie szybsze jest przejście komórek przez szkodliwy dla nich zakres temperatur (od ok. +20 do -20°C). Dodatkowym elementem wspomagającym bez wątpienia końcową skuteczność opisanych metod jest duża prostota techniczna, dzięki której możliwe jest wyeliminowanie niepotrzebnej, nadmiernej ekspozycji komórek na działanie stężonych roztworów środków osłaniających. Z dotychczasowych badań wynika, że optymalny okres ekwilibracji niektórych wrażliwych komórek (np.

oocytów bydła) w wysoko stężonych roztworach wityfikacyjnych wynosi 20-30 sek. (20, 29, 35). Jest to okres bardzo krótki, biorąc pod uwagę konieczność wymieszania komórek w gęstym, lepkiem płynie, następnie umieszczenie ich w słonce inseminacyjnej i wreszcie zamknięcie słomki np. poprzez zgrzanie jej końcówki. Dodatkowa, zupełnie już niepotrzebna ekspozycja komórek na toksyczne działanie roztworów wityfikacyjnych ma miejsce po ogrzaniu słomki i wynika ze zwłoki spowodowanej koniecznością obciążenia zatopionej końcówki i wypchnięcia płynu na zewnątrz słomki do przygotowanego roztworu płuczącego. Metody otwarte wyjątkowo dobrze sprawdzają się w tym kontekście, i to zarówno przed wityfikacją, jak i po ogrzaniu, które realizowane jest od razu w ciepłym roztworze płuczącym.

Efekty zastosowania otwartych metod wityfikacji

Jak już wspomniano, przełomowe okazały się badania dotyczące zarodków muszki owocowej (26, 40). W opisaną wówczas po raz pierwszy otwartej metodzie wityfikacji zastosowano nietypowy nośnik dla zarodków, w postaci siateczki preparacyjnej mikroskopu elektronowego (siateczka miedziana o średnicy 3 mm). Po dwustopniowej ekwilibracji w roztworze wityfikacyjnym zawierającym ostatecznie 8,5 mola glikolu etylenowego i 6% albuminy bydlęcej przenoszono zarodki w minimalnej objętości płynu (1-2 μ l) na siateczkę, którą umieszczano następnie w ciekłym propanie lub w schłodzonym (patrz niżej) ciekłym azocie. Analogiczną metodą posłużono się kilka lat później podczas wityfikacji oocytów bydła (2, 24). W rezultacie uzyskano rozwój *in vitro* 15% blastocyst (24), co stanowiło istotny postęp w stosunku do wyników poprzednich.

W 1998 r. ukazała się praca opisująca uzyskanie jeszcze wyższego odsetka blastocyst (25%) po zapłodnieniu oocytów wityfikowanych uprzednio w próbkach o zminimalizowanej objętości, ale tym razem umieszczonych nie na siateczce mikroskopowej lecz w końcówce tzw. OPS (Open Pulled Staws) czyli cienkich (rozciągniętych na gorąco) i nie zatopionych na końcu słomek inseminacyjnych (45). Autorzy ci, doskonaląc swoją metodę zastosowali ostatnio jeszcze cieńsze, tzw. mini OPS o średnicy stanowiącej 1/4 średnicy typowej słomki inseminacyjnej.

W międzyczasie ukazały się wyniki badań autora niniejszego artykułu (33, 35) prezentujące rozwój 30% blastocyst po zapłodnieniu *in vitro* oocytów wityfikowanych tzw. metodą kroplową opracowaną pierwotnie dla zarodków myszy (18). Wysokie zdolności rozwojowe zarodków uzyskanych tą metodą potwierdzone zostały *in vivo*. Stwierdzono rozwój 2 ciąży po transferze 4 zarodków oraz urodzenie w lutym 1999 r. zdrowego buhajka (35). Opisany, bardzo korzystny efekt wityfikacji wynikał z jednej strony z zastosowania zminimalizowanej próbki (oocyty wityfikowane były w kroplach roztworu wityfikacyjnego ($6 \pm 2 \mu$ l) wkra-

planego bezpośrednio do ciekłego azotu), zaś z drugiej – z zastosowania delikatnej preekwilibracji oocytów w silnie rozcieńczonym (3-4%) roztworze glikolu etylenowego. Analogiczną metodę preekwilibracji i wityfikacji wykorzystano ostatnio do kriokonserwacji oocytów służących następnie do enukleacji i klonowania somatycznego bydła (6). Główną różnicę stanowiło schładzanie kropli na powierzchni stalowego bloczka zmrożonego uprzednio w ciekłym azocie.

Należy podkreślić, że nadzwyczajna skuteczność i przydatność metod otwartych nie ograniczyły się wyłącznie do oocytów bydła. Po wityfikacji wyselekcjonowanego, najodporniejszego stadium zarodków uzyskano 28% dorosłych muszek owocowych (26). Również w przypadku zarodków bydła stwierdzono różnicę przeżywalności w zależności od ich stadium rozwojowego. Uzyskano odpowiednio 32, 50, 61 i 67% blastocyst z zarodków wityfikowanych w 1-4 dniu rozwoju *in vitro* (43, 45). Preekwilibracja, korzystna dla przeżywalności oocytów, również w przypadku zarodków podnosi ogólną skuteczność metody, umożliwiając rozwój do stadium blastocysty aż 71% trzydniowych, hodowanych *in vitro* zarodków bydła (34), jak również około 50% zarodków dwudniowych wityfikowanych w stadium ośmiokomórkowym. Metoda OPS znalazła już zastosowanie do wityfikacji zarodków świni (44) oraz niewielkiej, jak na razie liczby oocytów człowieka, prowadząc do uzyskania pierwszych ciąży po ich zapłodnieniu *in vitro* (16). Inny wariant otwartej metody wityfikacji polega na umieszczeniu zarodków na błonce roztworu wityfikacyjnego zawieszzonej wewnątrz nylonowej mini pętelki (19, 20). Pętelki takie, w tym przypadku osadzone (wtopione) w wewnętrznej części korka próbki, są wykorzystywane w fizyce do badań krystalograficznych. Po zanurzeniu pętelki w ciekłym azocie i zeszkleniu płynu umieszcza się ją we wnętrzu próbki, stanowiącej następnie osłonę dla komórek. Metodą tą udało się uzyskać po raz pierwszy żywe potomstwo chomika po transferze kriokonserwowanych (dwukomórkowych) zarodków (19), jak również bardzo wysoki odsetek prawidłowo rozwijających się blastocyst człowieka (20). Można również przypomnieć wcześniejsze zastosowanie metody kroplowej do wityfikacji zarodków bydła uzyskiwanych *in vivo* (37). Przynajmniej trzy z opisanych powyżej metod wityfikacji (OPS Vajty, pętelkowa Lane oraz kropelkowa Papisa) zyskały już ochronę patentową.

Przyspieszenie tempa schładzania ma wpływ na łatwiejsze osiągnięcie stanu zeszklenia przez wityfikowaną ciecz. Jedną z konsekwencji tej zależności jest kalkulowana przez badaczy możliwość obniżenia stężenia środków osłaniających w roztworach wityfikacyjnych rekompensowana zwiększeniem tempa schładzania. Jest jasne, że roztwory o niższym stężeniu mogą być lepiej tolerowane przez komórki. Jak dotychczas bardzo nieliczne prace opisują wpływ niższej koncentracji środków osłaniających podczas wi-

tryfikacji komórek metodą otwartą. Obniżenie stężenia glikolu etylenowego z 5,5 do 4,0 mola/litr nie zmniejszyło skuteczności witrifikacji oocytów bydła osadzonych na siateczce mikroskopowej (24). Tak więc, obniżenie stężenia środków osłaniających w roztworach witrifikacyjnych wydaje się możliwe, chociaż wymaga jeszcze dalszych badań. Tymczasem stosuje się na ogół standardowe roztwory witrifikacyjne opracowane dla potrzeb klasycznej witrifikacji zarodków ssaków. Najpowszechniej stosowany jest roztwór VS14 (1), zawierający glikol etylenowy (5,5 mola, tj. ok. 31%) i sacharozę (1,0 mol) (24, 32-35) lub trehalozę (2, 3). Glikol etylenowy i DMSO (po 20%) oraz 0,5 molowa sacharoza wchodzi w skład roztworu stosowanego w metodzie OPS (43-46). W metodzie pętłkowej (19, 20) zastosowano nieco więcej sacharozy (0,65 mola) i ficoll (10 mg/ml).

Problemy i perspektywy

Nazwanie opisywanych w tym artykule metod witrifikacji metodami „otwartymi” (bardziej powszechnie metody te określane są jako witrifikacja w zminimalizowanych próbkach, lub kroplach), wynika z faktu bezpośredniego kontaktu witrifikowanego płynu z ciekłym azotem. Pomimo różnych możliwości sterylizacji ciekłego azotu (filtracja, naświetlanie promieniami UV) (43, 46) metody te poddawane są często krytyce z punktu widzenia sanitarnego. Ich „otwartość” może sprzyjać przenoszeniu chorób zakaźnych, zwłaszcza o etiologii wirusowej (5). Ryzyko takie, nakładające się dodatkowo na opisywane już niebezpieczeństwo transmisji chorób poprzez transfer zarodków (m.in. 11, 12) może ograniczyć praktyczne zastosowanie otwartych metod witrifikacji zarówno w hodowli zwierząt, jak i w medycynie. Powstaje wobec tego pytanie o praktyczną przydatność tych metod do kriokonserwacji oocytów i zarodków. Wydaje się, że po pierwsze ryzyko zanieczyszczenia można, jeśli nie wyeliminować to przynajmniej znacznie ograniczyć (46), po drugie zaś pewne kierunki zastosowania np. witrifikowanych oocytów w eksperymentach związanych z klonowaniem ssaków czy kriokonserwacja zarodków owadów nie wymagają absolutnej sterylności, przynajmniej w skali laboratoryjnej. Z drugiej strony, otwarte metody witrifikacji wykorzystujące zjawisko wzrostu dynamiki zmian temperatury dzięki minimalizacji objętości próbki wskazały dalszy kierunek badań. Przyspieszenie tempa spadku temperatury można osiągnąć także innymi metodami. Jedną z takich metod jest użycie ciekłego azotu schłodzonego do temperatury $-209 \div -206^{\circ}\text{C}$. Umieszczenie próbki w „zwykłym” ciekłym azocie, utrzymywanym w stanie ciekłym w temperaturze bliskiej temperatury wrzenia (-196°C) powoduje jego gwałtowne wrzenie na styku z ciepłą początkowo próbką, a w konsekwencji swoiste odizolowanie próbki od azotu. Zjawisko wrzenia nie występuje w kontakcie próbki z oziębionym azotem, powodując przynajmniej dwukrotne przyspieszenie tempa

schładzania nawet do $-100\ 000^{\circ}\text{C}/\text{min}$. (3, 26, 40). Schłodzenie ciekłego azotu osiąga się względnie łatwo poprzez wzmoczenie parowania azotu w warunkach obniżonego ciśnienia. Ostatnio uzyskano bardzo wysoki odsetek partenogenetycznych blastocyst (31%), rozwiniętych po aktywacji oocytów bydła witrifikowanych w schłodzonym ciekłym azocie po umieszczeniu w słódkach inseminacyjnych (3).

Reasumując, można przyjąć, że opisane powyżej modyfikacje procedury witrifikacji polegające na zastosowaniu prekwilibracji, schłodzonego ciekłego azotu oraz otwartych metod witrifikacji zminimalizowanej próbki stanowią razem wzięte o jakościowym przełomie w kriobiologii. Nie znaczy to jednak, że uzyska się od razu remedium likwidujące wszystkie problemy związane z kriokonserwacją komórek. Istnieją pewne obiekty badawcze wciąż opierające się kriobiologom. Otwarte metody witrifikacji okazały się skuteczne w stosunku do oocytów bydła, jednak ich skuteczność ogranicza się do oocytów dojrzałych, znajdujących się w stadium II metafazy podziału mejotycznego. Natomiast metody te nie przyniosły jak dotąd poprawy efektów witrifikacji oocytów niedojrzałych, zahamowanych w stadium pęcherzyka zarodkowego (3% blastocyst) (21). W badaniach własnych uzyskano ok. 8% blastocyst (32), co także nie jest wynikiem lepszym od najlepszych rezultatów tradycyjnego zamrażania (9% (41)), czy klasycznej witrifikacji (6%) (15). Nie ulega wątpliwości, że niedojrzała komórka jajowa, zahamowana u większości ssaków w stadium profazy I podziału mejotycznego, stanowi wraz z warstwami otaczającymi ją komórek ziarnistych pęcherzyka (*cumulus oophorus*) bardzo skomplikowany układ biologiczny i jest równocześnie bardzo trudnym modelem w badaniach kriobiologicznych. Prawidłowy przebieg procesu dojrzewania oocytów wymaga zarówno *in vivo* jak i na obecnym etapie technologii produkcji zarodków *in vitro* zgodnego współdziałania obu, ściśle ze sobą połączonych elementów kompleksu cumulus – oocyt. Tak więc skuteczna metoda kriokonserwacji oocytów niedojrzałych uwzględniać powinna wymagania obu komponentów kompleksu, chyba że uda się uniezależnić dojrzewanie oocytów od obecności komórek pęcherzykowych.

Piśmiennictwo

1. Ali J., Shelton J. N.: Successful vitrification of day-6 sheep embryos. J. Reprod. Fertil. 1993, 99, 65-70.
2. Arav A., Zeron Y.: Vitrification of bovine oocytes using modified minimum drop size technique (MDS) is effected by the composition and the concentration of the vitrification solution and by the cooling conditions. Theriogenology 1997, 47, 342.
3. Arav A., Zeron Y., Ocheretny A.: A new device and method for vitrification increases the cooling rate and allows successful cryopreservation of bovine oocytes. Theriogenology, 2000, 53, 248.
4. Bielański A.: Survival in vitro of zona pellucida-free mouse embryos after cooling by conventional two-step or vitrification methods. Cryo-Letters 1987, 8, 294-302.
5. Bielański A., Nadin-Davies S., Sapp T., Lutze-Wallace C.: Viral contamination in liquid nitrogen. Cryobiology 2000, 40, 110-116.
6. Dinnyes A., Dai Y., Jiang S., Yang X.: Somatic cell nuclear transfer with vitrified recipient oocytes in cattle. Theriogenology 2000, 53, 215.

7. Dobrinsky J., 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. Gajda B., Smorag Z., Wierzbowski S., Jura J., Wieczorek B.: Transfer of vitrified sheep morula. *Zuchthyg.* 1989, 24, 97-100.
9. Hamano S., Koikeda A., Kuwayama M., Nagai T.: Full-term development of in vitro-matured, vitrified and fertilized bovine oocytes. *Theriogenology* 1992, 38, 1085-1090.
10. Hochi S., Fujimoto T., Braun J., Oguri N.: Pregnancies following transfer of equine embryos cryopreserved by vitrification. *Theriogenology*, 1994, 48, 483-488.
11. Jaśkowski J. M., Twardoń J., Zbylut J.: Sanitarne aspekty przenoszenia zarodków u bydła. *Życie wet.* 1999, 74, 10-13.
12. Jaśkowski J. M., Zbylut J., Gehrke M.: Ryzyko transmisji chorób poprzez transfer zarodków u małych przeżuwaczy, świń i koni. *Medycyna Wet.* 2000, 56, 207-210.
13. Kasai M., Komi J. H., Takakamo A., Tsudera H., Sakurai T., Machida T.: A simple method for mouse embryo cryopreservation in a low toxicity vitrification solution, without appreciable loss of viability. *J. Reprod. Fertil.* 1990, 89, 90-97.
14. Kobayashi K., Nagashima H., Yamakawa H., Kato Y., Ogawa S.: The survival of whole and bisected rabbit morulae after cryopreservation by the vitrification method. *Theriogenology* 1990, 33, 777-788.
15. Küchenmeister U., Kuwayama M.: In vitro blastocyst formation after vitrification of immature bovine oocytes. *Theriogenology* 1997, 47, 297.
16. Kuleshova L., Gianaroli L., Magli C., Ferraretti A., Trounson A.: Birth following vitrification of small number of human oocytes. *Hum. Reprod.* 1999, 14, 3077-3079.
17. Kuwayama M., Holm P., Jacobsen H., Greve T., Callesen H.: Successful cryopreservation of porcine embryos by vitrification. *Vet. Rec.* 1997, 142, 365.
18. Landa V., Tepla O.: Cryopreservation of mouse 8-cell embryos in microdrops. *Folia Biologica (Praha)* 1990, 153-158.
19. Lane M. W., Forest K. T., Lyons E. A., Bavister B. D.: Live birth following vitrification of hamster embryos using a novel containerless technique. *Theriogenology* 1999, 51, 167.
20. Lane M., Schoolcraft W. B., Gardner D. K.: Vitrification of mouse and human blastocysts using a novel cryoloop container-less technique. *Fertil. Steril.* 1999, 72, 1073-1078.
21. Le Gal F., Massip A.: Cryopreservation of cattle oocytes: effects of meiotic stage, cycloheximide treatment and vitrification procedure. *Cryobiology* 1999, 38, 290-300.
22. Leibo S. P., Martino A., Kobayashi S., Pollard J. W.: Stage dependent sensitivity of oocytes and embryos to low temperatures. *Anim. Reprod. Sci.* 1996, 42, 45-53.
23. Lopez-Gatius F., Camon-Urgel J.: Pregnancies and live offspring following transfer of one-step vitrified bovine embryos. *Zuchthyg.* 1989, 24, 255-258.
24. Martino A., Songsasen N., Leibo S. P.: Development into blastocysts of bovine oocytes cryopreserved by ultra-rapid cooling. *Biol. Reprod.* 1996, 54, 1059-1069.
25. Massip A., Van Der Zwalmen P., Scheffén B., Ectors F.: Pregnancies following transfer of cattle embryos preserved by vitrification. *Cryo-Lett.* 1986, 7, 270-273.
26. Mazur P., Cole K. W., Hall W. H., Schreuders P. D., Mahowald A. P.: Cryobiological preservation of *Drosophila* embryos. *Science* 1992, 258, 1932-1935.
27. Mukaida T., Wada S., Takahashi K., Pedro P. B., An T. Z., Kasai M.: Vitrification of human embryos based on the assessment suitable conditions for 8-cell mouse embryos. *Human Reprod.* 1998, 13, 2874-2879.
28. Otoi T., Yamamoto K., Koyama N., Tachikawa S., Suzuki T.: Cryopreservation of mature bovine oocytes by vitrification in straws. *Cryobiology*, 1998, 37, 77-85.
29. Papis K., Avery P., Holm P., Callesen H., Greve T.: The effect of vitrification solution, equilibration time and direct dilution method on survivability of equilibrated or vitrified bovine in vitro matured oocytes. *Theriogenology* 1995, 43, 293.
30. Papis K., Fujikawa S., Kojima T., Oguri N.: Effect of the composition of vitrification media on survival of rabbit embryos. *Cryobiology* 1993, 30, 98-105.
31. Papis K., Kojima T., Oguri N.: Study of vitrification of rabbit embryos – an effect of sucrose addition. *Cryobiology* 1991, 28, 71.
32. Papis K., Shimizu M., Izaike Y.: Preliminary results of vitrification of bovine immature oocytes. *Anim. Sci. Pap. Rep.* 1998, 16 (Suppl. 1), 63-65.
33. Papis K., Shimizu M., Izaike Y.: The effect of gentle pre-equilibration on survival and development rates of bovine in vitro matured oocytes vitrified in droplets. *Theriogenology* 1999, 51, 173.
34. Papis K., Shimizu M., Izaike Y.: A highly efficient, modified vitrification method, for Day 2 in vitro produced bovine embryos *Cryo-Lett.* 1999, 20, 203-206.
35. Papis K., Shimizu M., Izaike Y.: Factors affecting the survivability of bovine oocytes vitrified in droplets. *Theriogenology* 2000, 54, 651-658.
36. Rall W. F., Fahy G. M.: Ice-free cryopreservation of mouse embryos at -196°C by vitrification. *Nature* 1985, 313, 573-575.
37. Riha J., Landa V., Kneissl, Matus J., Jindra M., Klouček Z.: Vitrification of cattle embryos by direct dropping into liquid nitrogen and embryo survival after non-surgical transfer. *Živoč. Vyr.* 1992, 36, 113-119.
38. Scheffén B., Van Der Zwalmen P., Massip A.: A simple and efficient procedure for preservation of mouse embryos by vitrification. *Cryo-Lett.* 1986, 7, 260-269.
39. Smorag Z., Gajda B., Wieczorek B., Jura J.: Stage-dependent viability of vitrified rabbit embryos. *Theriogenology* 1989, 31, 1227-1232.
40. Steponkus P. L., Myers S. P., Lynch D. V., Gardner L., Bronshteyn V., Leibo S. P., Rall W. F., Pitt R. E., Lin T-T., MacIntyre R. J.: Cryopreservation of *Drosophila* melanogaster embryos. *Nature* 1990, 345, 170-172.
41. Suzuki T., Boediono A., Takagi M., Saha S., Sumantri C.: Fertilization and development of frozen-thawed germinal vesicle bovine oocytes by one-step dilution method in vitro. *Cryobiology* 1996, 33, 515-524.
42. Szell A., Zhang J., Hudson R.: Rapid cryopreservation of sheep embryos by direct transfer into liquid nitrogen vapour at -180°C. *Reprod. Fertil. Dev.* 1990, 2, 613-618.
43. Vajta G., Booth P. J., Holm P., Greve T., Callesen H.: Successful vitrification of early stage bovine in vitro produced embryos with the Open Pulled Straw (OPS) method. *Theriogenology* 1997, 47, 501-509.
44. Vajta G., Holm P., Greve T., Callesen H.: Vitrification of porcine embryos using the Open Pulled Straw (OPS) method. *Acta Vet. Scand.* 1997, 38, 349-352.
45. Vajta G., Holm P., Kuwayama M., Booth P. J., Jacobsen H., Greve T., Callesen H.: Open Pulled Straw (OPS) vitrification: A new way to reduce cryoinjuries of bovine ova and embryos. *Mol. Reprod. Dev.* 1998, 51, 53-58.
46. Vajta G., Lewis I. M., Kuwayama M., Greve T., Callesen H.: Sterile application of the Open Pulled Straw (OPS) vitrification method. *Cryo-Lett.* 1998, 19, 389-392.
47. Yoshino J., Kojima T., Shimizu M., Tomizuka T.: Cryopreservation of porcine blastocysts by vitrification. *Theriogenology* 1992, 38, 326.

Adres autora: dr Krzysztof Papis, Jastrzębiec, ul. Łąkowa 1 m. 2, 05-552 Wólka Kosowska; e-mail: kpapis@yahoo.com

BAIRDON K., BROWN S. R., MC GOLDRICK J., PARKER L. D., TALTY P. J.: Skuteczność 2% żelu moxidectin w przypadku strongyloidozy koni nabytej na drodze naturalnej ze szczególnym uwzględnieniem larw *Cyathostomum*. (Efficacy of moxidectin 2 per cent gel against naturally acquired strongyle infections in horses, with particular reference to larval cyathostomes). *Vet. Rec.* 148, 138-141, 2001 (5)

Drobne słupkowce *Cyathostomum* wywołują u koni różne syndromy chorobowe, w tym chroniczną biegunkę, spadek masy ciała, utratę łaknienia. Kliniczna postać choroby występuje częściej u koni młodych. Skuteczność terapeutyczną moxidectin 2 formie 2% żelu w infekcjach wywołanych przez słupkowce przebadano na 18 koniach w wieku 12-18 miesięcy, które przed leczeniem wypasano przez 3 tyg. na pastwisku zanieczyszczonym zakaźnymi formami słupkowców, w tym *Cyathostomum*. Na 24 godz. przed leczeniem ubito wybrane losowo 2 osobniki w celu określenia stopnia zarażenia słupkowcami. Osiem nieleczonych zwierząt stanowiło kontrolę. U 8 koni zastosowano żel w dawce 1 ml/50 kg masy ciała (0,4 mg moxidectin/kg masy ciała). Po 8 tygodniach zwierzęta zabito i określono stopień zarażenia słupkowcami. Średnia geometryczna liczby pasożytów w grupie kontrolnej wynosiła dla *Strongylus vulgaris* 26, *S. edentatus* 263, *Triodontophorus* 48, zaś w grupie leczonej 0. Tak więc skuteczność terapeutyczną moxidectin 2% żel wynosiła 100% w przypadku dojrzających postaci tych pasożytów. Stadium L3 *Cyathostomum* po leczeniu uległo redukcji o 90%. DL o 99,9%, zaś liczba jaj w kale spadła w grupie leczonej w porównaniu do kontroli o 96-100%.