

# Podatność zarodków owcy na witrifikację w zależności od ich stadium rozwojowego

KRZYSZTOF PAPIS, MACIEJ KORWIN KOSSAKOWSKI,  
ANDRZEJ GUSZKIEWICZ, JACEK A. MODLIŃSKI

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

Papis K., Korwin Kossakowski M., Guskiewicz A., Modliński J. A.

## Cryosensitivity of sheep preimplantation embryos vitrified at different developmental stages

### Summary

Surgically obtained early sheep embryos collected at morula, blastocyst, expanded blastocyst or hatching/hatched blastocyst developmental stages were subjected to vitrification. The experiment was carried out by the traditional vitrification method, employing 0.25 ml insemination straws as carriers of embryos. The vitrification medium (VM) based on a modified phosphate-buffered solution (PB1) containing 3.0 g/L bovine serum albumin consisted of 1,2-propanediol, glycerol and sucrose (2.72 M, 1.36 M and 1.0 M – respectively). Embryos (each stage separately) were loaded into straws after 7-10 min of saturation in an equilibration solution (without sucrose). After 1 min period of saturation in VM embryos were plunged into liquid nitrogen. After warming, embryos were cultured *in vitro* and/or were surgically transferred to a surrogate mother for survival examination. Of 71 embryos tested, only 13 (18.3%) revealed development *in vitro*. The highest survival rate was observed in the most advanced group of embryos. Of 10 hatching/hatched embryos 6 (60%) survived (reexpanded). Three lambs were born after the transfer of 3 embryos from this group.

**Keywords:** vitrification, sheep, embryo

Przenoszenie zarodków owcy ma z wielu powodów mniejsze praktyczne znaczenie niż przenoszenie zarodków bydła. Jednak bywa użyteczne zarówno w praktyce hodowlanej tego gatunku, jak i w doświadczeniach (5). Zarodki owcy zarówno pozyskiwane *in vivo*, jak i produkowane *in vitro* były w przeszłości i są nadal często wykorzystywane m.in. do badań nad klonowaniem zwierząt (bliźnięta monozygotyczne, owca Dolly) czy nad kriokonserwacją. W tym drugim przypadku zarodki owcy traktowane były często jako model w badaniach nad kriokonserwacją zarodków bydła, ale występowały też jako samoistny obiekt badawczy.

Tradycyjne zamrażanie zarodków metodami powolnego schładzania zawdzięcza zarodkom owcy tzw. skróconą (lub dwustopniową) metodę mrożenia, w której powolne schładzanie przerywano umieszczeniem próbek w ciekłym azocie już w temperaturach ok.  $-30^{\circ}\text{C}$ , umożliwiającą prawie trzykrotne skrócenie całej procedury zamrażania, wymagającej początkowo nawet ok. 6 godzin schładzania (38). W tym samym czasie także w naszym kraju prowadzone były podobne badania nad kriokonserwacją zarodków owcy (29, 30), a nieco później m.in. nad wykorzystaniem nowego wówczas środka osłaniającego – metanolu, którego efektywność porównywano z tradycyjnie używanym dimetylosulfotlenkiem (DMSO) (7), oraz nad zamrażaniem zarodków owcy podzielonych mikrochirurgicznie na dwie połowy w celu uzyskania monozygotycznych bliźnięt (6).

Wprowadzenie w połowie lat osiemdziesiątych do kriokonserwacji zarodków ssaków metody witrifikacji – pozwalającej dzięki raptownemu schładzaniu na bezkrystaliczne zestalenie (zeszklenie) cieczy (24), zaowocowało wkrótce udanymi próbami witrifikacji zarodków owcy (1, 10, 14, 22, 26, 27, 31, 32) (tab. 3). Należy podkreślić, że pierwsze na świecie jagnięta urodzone po transferze zarodków owcy poddanych witrifikacji uzyskano w wyniku badań przeprowadzonych w Polsce (10). W ww. badaniach witrifikacji poddano zarodki w stadium moruli, uzyskując bardzo dobre wyniki. Tymczasem w licznych kolejnych badaniach podejmujących zagadnienia kriokonserwacji zarodków ssaków wskazywano na ogół (zwłaszcza u owcy i świni, w mniejszym stopniu u bydła) na wyższą odporność zarodków bardziej zaawansowanych w rozwoju, np. ekspandowanych (rozrośniętych) blastocyst (12, 14), ale także blastocyst wylęgających się lub wylętych z osłonki przejrzystej (14). Zależność taką w przypadku owcy obserwowano w zdecydowanej większości przeprowadzonych badań, bez względu na zastosowane techniki kriokonserwacji (tradycyjne zamrażanie, witrifikacja, a nawet najnowsze „otwarte” metody witrifikacji z zastosowaniem próbek mikroobjętościowych) (cyt. 21). Metody „otwarte” pozwoliły jednak na podniesienie skuteczności kriokonserwacji zarodków w stadium moruli, zwłaszcza u świni (3) i bydła (35). W przypadku bydła witrifikacja mikroobjętościowa umożliwiła uzyskanie wysokiej przeżywalności jeszcze młodszych stadiów

zarodkowych, zwłaszcza zarodków 8-16-komórkowych (20, 34, 35), co metodami tradycyjnego zamrażania czy tradycyjnej witrifikacji było nieosiągalne.

Skuteczne przeprowadzenie witrifikacji zarodków wymaga zastosowania wysoko stężonego roztworu środków osłaniających. Roztwór taki zawierający często ponad 50-60% objętościowych substancji, takich jak: glicerol, DMSO czy glikol etylenowy, jest sam z siebie oczywistym zagrożeniem dla kriokonserwowanych zarodków (czy szerzej – dla każdego rodzaju komórek). Jego zastosowanie wymaga wielkiej troski o zminimalizowanie skutków ubocznych. Co zrozumiałe, jednym z kierunków badań nad witrifikacją zarodków ssaków jest więc poszukiwanie stosunkowo najmniej toksycznych roztworów witrifikacyjnych (1). Jednym z najmniej stężonych roztworów witrifikacyjnych opisanych do dzisiaj, wykazujących zdolność do zeszklenia i do ochrony witrifikowanych zarodków, jest medium witrifikacyjne (VM) opracowane dla zarodków królika (19) zawierające 2,72-molowy glikol propylenowy (1,2 propandiol), 1,36-molowy glicerol (w sumie 30% objętościowych) oraz 1-molowy roztwór sacharozy, stanowiące istotną modyfikację roztworu witrifikacyjnego opisanego przez Scheffena i Mas-sipa (25).

Celem badań była ocena przydatności medium witrifikacyjnego (VM) do witrifikacji zarodków owcy w różnych stadiach rozwojowych.

### Materiał i metody

Zarodki pozyskiwano od 19 superowulowanych dawczyń w 6-7 dni od wystąpienia rui, metodą chirurgiczną, wypłukując je z rogów macicy udoświadczonych dzięki laparotomii w linii białej. Dawczyni poddawano premedykacji przy pomocy ksylazyny (Xylavet, Scanvet, Polska) w dawce 0,02 mg/kg i ogólnego znieczulenia przy pomocy ketaminy (Narkomon, Spofa, Czechy). Do pozyskiwania zarodków używano zmodyfikowanego roztworu Dulbecco PBS wzbogaconego dodatkiem glukozy, pirogronianu i albuminy surowicy bydlęcej (BSA) (PB1; 37). Wszystkie odczynniki wykorzystywane w doświadczeniu pochodziły z firmy Sigma (St Luis, Mo. USA) – o ile nie podano inaczej.

Zarodki odnajdywano w płynie PB1 przy pomocy mikroskopu stereoskopowego, oceniano morfologicznie, a następnie umieszczano w kroplach pożywki Menezo B2 (INRA) wzbogaconej 10% bydlęcej surowicy płodowej (FCS) i inkubowano w inkubatorze do momentu użycia. Do badań kwalifikowano zarodki prawidłowe morfologicznie, bez względu na stadium rozwojowe (od stadium moruli do wyklutej blastocysty).

W badaniach zastosowano metodę witrifikacji i roztwory opracowane wcześniej dla zarodków królika (19). Stosowane roztwory do ekwilibracji i witrifikacji zarodków oraz do usuwania środków osłaniających po rozmrożeniu (ogrzaniu) zarodków oparte były na zmodyfikowanym roztworze PB1 (36). Koncentrację soli w roztworach: ekwilibracyjnym (Isotonic Equilibration Medium; IEM), witrifikacyjnym (Vitrification Medium; VM) i wypłukującym (Isotonic Sucrose Solution; ISS) ustalano w stosunku do ostatecznej objętości roztworu wraz ze środkami osłaniającymi (mole/litr). Zawartość środków osłaniających w poszczególnych roztworach i metodę ich przygotowania przedstawia tab. 1.

Procedura witrifikacji była następująca: zarodki umieszczano w 2 ml IEM zawierającego 10% obj. (1,36 mola) glice-

**Tab. 1. Zawartość roztworów: ekwilibracyjnego (IEM), witrifikacyjnego (VM) i wypłukującego (ISS) zastosowanych w badaniach (19)**

Składniki	Rodzaj roztworu		
	ekwilibracyjny (IEM)	witrifikacyjny (VM)*	wypłukujący (ISS)
PB1 2 × stężony	45 ml	31,5 ml	45 ml
1,2 propandiol	20 ml	20 ml	–
Glicerol	10 ml	10 ml	–
Sacharoza	–	34,23 g	34,23 g
H <sub>2</sub> O	ad 100 ml	ad 100 ml	ad 100 ml

Objaśnienie: \* – roztwór witrifikacyjny zawiera ok. 70% izotonicznego stężenia soli, określonego w stosunku do objętości ostatecznej roztworu (mole/litr)

**Tab. 2. Rozwój *in vitro* witrifikowanych, wczesnych zarodków owcy w zależności od ich stadium rozwojowego**

Morule i blastocysty wczesne	Blastocysty	Blastocysty wylęgające się lub wylęte	Razem
4/29 (13,8%) <sup>a</sup>	3/32 (9,4%) <sup>a</sup>	6/10 (60,0%) <sup>b</sup>	13/71 (18,3%)

Objaśnienie: a różne od b przy  $p \leq 0,05$  (dwustronny test Chi-kwadrat z poprawką Yatesa)

rolu i 20% obj. (2,72 mola) propandiolu na okres 7-10 min. ekwilibracji. Następnie przekładano je do roztworu witrifikacyjnego (VM) zawierającego dodatkowo 1,0 mol sacharozy na okres 1 min. W tym czasie zarodki umieszczano w słonce inseminacyjnej (0,25 ml objętości), w części słomki wypełnionej ok. 25  $\mu$ l VM. Pozostała część słomki wypełniona była uprzednio roztworem sacharozy (ISS). Poszczególne roztwory oddzielane były od siebie w słonce – standardowo – niewielkimi pęcherzykami powietrza. Wolny koniec słomki zgrzewano i słomkę umieszczano bezpośrednio (ale stopniowo, aby nie rozsądził jej zamarzający roztwór sacharozy) w ciekłym azocie. Po kilku-kilkudziesięciu dniach przechowywania słomkę poddawano ogrzewaniu poprzez zanurzenie na ok. 7 sekund w wodzie o temperaturze 25°C. Następnie zawartość słomki ewakuowano do przygotowanego roztworu 1-molowej sacharozy (ISS), a po kilku minutach odszukane zarodki przenoszono do 0,25-molowego roztworu sacharozy. Wymywanie środków osłaniających kończono po kolejnych 10 min. w roztworze PB1. Zarodki oceniano morfologicznie i w celu określenia ich możliwości rozwojowych *in vitro* umieszczano je w 50  $\mu$ l kroplach pożywki Menezo B2 pokrytych olejem parafinowym (Merck) na szalkach petriego ( $\varnothing$  60 mm., Corning). Szalki umieszczano w inkubatorze w temperaturze 38,5°C w atmosferze 5% tlenu, 5% dwutlenku węgla i 90% azotu przy pełnej wilgotności. Rozwój zarodków oceniano co 24 godziny przez 3 kolejne doby. Przeżywalność zarodków określano na podstawie odsetka zarodków rozwiniętych do stadium rosnącej blastocysty (morule) blastocysty wykluwającej się lub wyklutej z osłonki przejrzystej (blastocysty) lub reekspandowanych (blastocysty wyklute lub wykluwające się). Część blastocyst (z grupy najbardziej zaawansowanych w rozwoju – wyklutych lub wykluwających się) po ok. 12 godz. hodowli *in vitro* przeznaczono do oceny przeżywalności *in vivo*, przenosząc je chirurgicznie do macicy zsynchronizowanych biorecipientek. Zabieg transferu zarodków przebiegał analogicznie do opisanego wcześniej zabiegu ich pozyskiwania.

## Wyniki i omówienie

Ogółem od 19 dawczyń uzyskano 80 zarodków i 44 niezapłodnione komórki jajowe. Osiem zarodków uznano za nieprawidłowe (zdegenerowane lub zatrzymane w rozwoju). Hodowla *in vitro* 71 zarodków owcy odzyskanych po rozmrożeniu (ograniczeniu) wykazała różny stopień odporności zarodków na zastosowaną metodę kriokonserwacji, zależny od ich stadium rozwojowego (tab. 2). Określony *in vitro* odsetek zarodków wykazujących zdolność do rozwoju mieścił się w zakresie od 9,4% do 13,8% dla zarodków w stadiach blastocysty i moruli, do 60% w przypadku blastocyst bardziej zaawansowanych w rozwoju (wykluwających się lub wyklutych z osłonki przejrzystej). Transfer 3 zarodków wykluwających się lub wyklutych z osłonki przejrzystej do bioczyń przyniósł urodzenie się 3 jagniąt.

Przedstawione rezultaty wykazują dużą zależność efektów zastosowanej metody wtryfikacji od stadium rozwojowego wtryfikowanych zarodków. Zadowolający odsetek zarodków przeżywających procedurę wtryfikacji uzyskano wyłącznie w grupie zarodków najbardziej zaawansowanych w rozwoju (wyklutych lub wykluwających się z otoczki przejrzystej). Testowana metoda kriokonserwacji, bardzo skuteczna w przypadku młodszych (w stadium moruli) zarodków królika nie sprawdziła się więc wobec analogicznych rozwojowo zarodków owcy (19). Metoda okazała się natomiast dość efektywna w stosunku do zarodków starszych, co potwierdzają zarówno testy przeprowadzone *in vitro*, jak i urodzenie 3 jagniąt po transferze trzech zarodków do bioczyń. W teście *in vivo* metoda okazała się więc bardzo skuteczna, chociaż ze względu na ograniczoną liczbę dostępnych bioczyń skuteczność metody w tym aspekcie wymagałaby potwierdzenia na liczniejszym materiale.

Ogólnie biorąc, przedstawione wyniki potwierdzają opisaną w piśmiennictwie tendencję do wyższej odporności zarodków starszych na zastosowane metody kriokonserwacji (13, 14, 30) (tab. 3). Z drugiej strony, uznać należy, że opisana tutaj metoda wtryfikacji, jakkolwiek skuteczna wobec zarodków królika, gorzej sprawdza się w stosunku do zarodków owcy. Spośród przyczyn takiego stanu rzeczy wymienić można m.in. niską zawartość substancji makrocząsteczkowych w zastosowanych roztworach wtryfikacyjnych (IEM, VM, ISS). W opisanym doświadczeniu nie zastosowano dodatku surowicy do wspomnianych roztworów, która, pomimo zgłaszanych

Tab. 3. Dotychczasowe rezultaty wtryfikacji zarodków owcy

Stadium zarodków	Roztwór wtryfikacyjny	Rezultat i warunki oceny	Autorzy
Morule	GL35%, PG30% lub GL30%, PR35%	<i>in vivo</i> 50% (6/12)	Gajda i wsp. 1989
Morule i wczesne blastocysty	GL25%, PG25%	<i>in vitro</i> 36%, <i>in vivo</i> 11%	Shell i wsp. 1990
Blastocysty		<i>in vitro</i> 70%, <i>in vivo</i> 32%	
Morule i wczesne blastocysty	GL25%, PG25%	<i>in vitro</i> 0%	McGinnis i Youngs 1990
Blastocysty ekspandowane i wylęgające się		<i>in vitro</i> 33%	
Morule i blastocysty	GL 6,5 M	<i>in vivo</i> 29% (2/7)	Schiewe i wsp. 1991
Morule	EG 6,0 M, GL 1,8 M	<i>in vivo</i> 55%,	Ali i Shelton 1993
Blastocysty		<i>in vivo</i> 62%	
Morule i blastocysty	EG 5,5 M, sacharoza 1,0 M	<i>in vivo</i> 50%	
Morule i blastocysty	GL 3,5 M, PG 3,5 M	<i>in vivo</i> 52%	Szell i Windsor 1994
Morule i blastocysty	GL 25%, PG 25%	<i>in vitro</i> od 0% do 19%	Paz i wsp. 1994
Ekspandujące blastocysty	GL 3,4 M, EG 4,6 M	<i>in vitro</i> 83%, <i>in vivo</i> 80%	Naitana i wsp. 1995
Morule i blastocysty	GL 25%, EG 25%	<i>in vitro</i> 58%, <i>in vivo</i> 27%	Martinez i Matkovic 1997
	EG 40%, Ficoll 18%, sacharoza 0,5 M	<i>in vitro</i> 54%, <i>in vivo</i> 38%	
Blastocysty (IVP)	GL 25%, EG 25%	<i>in vivo</i> 24%	Ptak i wsp. 1999
Ekspandowane blastocysty	GL 25%, EG 25%	<i>in vitro</i> 84% <i>in vivo</i> 63%	Dattena i wsp. 2000
Ekspandowane blastocysty (IVP)	jw.	<i>in vitro</i> 68%, <i>in vivo</i> 15%	
Morule do ekspandujących blastocyst	GL 25%, EG 25%	<i>in vivo</i> 50%	Baril G. i wsp. 2001
Wczesne blastocysty	EG 40%, Ficoll 18%, sacharoza 0,5 M	<i>in vitro</i> 96%, <i>in vivo</i> 47%	Zhu i wsp. 2001
Wczesne blastocysty (IVP)	jw.	<i>in vitro</i> 93%, <i>in vivo</i> 29%	
Morule do blastocyst	EG 20%, DMSO 20% (OPS)	<i>in vivo</i> 35%	Papadopoulos i wsp. 2002
Blastocysty (IVP)	jw.	<i>in vivo</i> 2,5%	
Ekspandowane blastocysty (IVP)	GL 3,4 M, EG 4,6 M	<i>in vitro</i> 87%	Leoni i wsp. 2002
Ekspandowane blastocysty	GL 25%, EG 25% DMSO 20%, EG 20%, sacharoza 0,3 M	<i>in vivo</i> 57,1-62,9%	Dattena i wsp. 2004
Ekspandowane blastocysty (IVP)	GL 25%, EG 25% DMSO 20%, EG 20%, sacharoza 0,3 M	<i>in vivo</i> 14,7-23,8%	

Objaśnienia: DMSO – dimetylosulfotlenek; GL – glicerol; PG – glikol propylenowy (1,2 propandiol); EG – glikol etylenowy; M oznacza molowość roztworu (mol/litr); OPS – metoda wtryfikacji mikroobjętościowej w otwartych wyciągniętych słódkach; IVP – zarodki uzyskiwane *in vitro*

często zastrzeżeń natury sanitarno-weterynaryjnej jest wciąż powszechnie stosowana w tego typu roztworach i to często w wysokim stężeniu – np. 20%. Pomimo licznych doświadczeń z użyciem m.in. kwasu hialuronowego, poliwinylpirolidyny, alkoholu poliwinylowego czy różnych frakcji albuminy surowicy bydłowej (BSA) (też nie całkiem wolnej od ryzyka wirusowej kontaminacji) nie udało się, jak dotąd, znaleźć lepszych od surowicy dodatków do roztworów kriogenicznych. Badania przeprowadzone na zarodkach owcy uzyskiwanych *in vitro* wykazały istotny, korzystny wpływ surowicy zarówno na skuteczność samego procesu wtryfikacji, jak i na efektywność procedury ogrzewania zarodków i wypłukiwania roztworów osłaniających (12). Porównywany w tamtych badaniach alkohol poliwinylowy okazał się istotnie gorszy od surowicy. W roztworach użytych w niniejszych badaniach występuje jedynie niewielki dodatek BSA (ok. 1,5 g/L w roztworze wtryfikacyjnym) pochodzący z bazowego roztworu PB1 zawierającego 3 g BSA w litrze, odpowiednio rozcieńczonego przez dodatki substancji osłaniających (propandiol, glicerol, sacharoza). Podobny, słaby efekt wtryfikacji zarodków owcy bez surowicy uzyskano wcześniej w Hiszpanii (22). Można zakładać, że zastosowanie dodatku surowicy podniosłoby skuteczność kriokonserwacji zarodków owcy. Jednak stwierdzenie takiej ewentualnej poprawy skuteczności roztworów wtryfikacyjnych uzupełnionych dodatkiem surowicy wymagałoby dalszych badań. Równocześnie wydaje się, że w świetle prezentowanych ostatnio wyników wtryfikacji zarodków owcy (ale także zarodków bydła i świni) coraz większe nadzieje na wydajne zastosowanie tych metod w praktyce upatrywać należy w metodach wtryfikacji zarodków w próbkach mikroobjętościowych (takich jak wtryfikacja w OPS) (3, 11, 20, 34, 35).

Warto również zauważyć, że zarodki owcy uzyskane *in vitro* na ogół znacznie słabiej przeżywiają kriokonserwację, podobnie jak to wielokrotnie wykazano w przypadku zarodków bydła (8, 11, 23, 36). Toteż bardzo obiecujące wydają się pojawiające się ostatnio w piśmiennictwie tendencje do ukierunkowanych modyfikacji warunków hodowli *in vitro*, mających na celu poprawę wybranych cech zarodków, podnoszących szanse przetrwania przez zarodki procedur kriokonserwacji (28).

Reasumując, uznać należy, że zarodki owiec wykazują zróżnicowaną podatność na wtryfikację przy użyciu opisanej metody. Najwyższą podatność wykazują zarodki najstarsze – blastocysty wyklute lub wykluwające się z osłonki przejrzystej.

### Piśmiennictwo

1. Ali J., Shelton J. N.: Successful vitrification of day-6 sheep embryos. *J. Reprod. Fertil.* 1993, 99, 65-70.
2. Baril G., Traldi A.-L., Cagnie Y., Leboeuf B., Beckers J. F., Mermillod P.: Successful direct transfer of vitrified sheep embryos. *Theriogenology* 2001, 56, 229-305.
3. Barthelot F., Martinat-Boite F., Locatelli A., Perreau C., Terqui M.: Piglets born after vitrification of embryos using the open pulled straw method. *Cryobiology* 2000, 41, 116-124.
4. Cocero M. J., Lopez Sebastian A., Barragan M. L., Picazo R. A.: Differences on post-thawing survival between ovine morulae and blastocysts cryopreserved with ethylene glycol or glycerol. *Cryobiology* 1996, 33, 502-507.
5. Cagnie Y.: State of the art in sheep-goat embryo transfer. *Theriogenology* 1999, 51, 105-116.
6. Członkowska M., Papis K., Guszkiwicz A., Kossakowski M.: Survival of agar protected sheep demi embryos after freezing. *Cryo-Lett.* 1992, 13, 293-296.
7. Członkowska M., Papis K., Guszkiwicz A., Kossakowski M., Eysymont U.: Freezing of sheep embryos in 3.0 M methanol. *Cryo-Lett.* 1991, 12, 11-16.

8. Dattena M., Accardo C., Pilichi S., Isachenko V., Mara L., Chesa B., Cappai P.: Comparison of different vitrification protocols on viability after transfer of ovine blastocysts *in vitro* produced and *in vivo* derived. *Theriogenology* 2004, 62, 481-493.
9. Dattena M., Ptak G., Loi P., Cappai P.: Survival and viability of vitrified *in vitro* and *in vivo* produced ovine blastocysts. *Theriogenology* 2000, 53, 1511-1519.
10. Gajda B., Smorag Z., Wierzbowski S., Jura J., Wieczorek B.: Transfer of vitrified sheep morula. *Zuchthyg.* 1989, 24, 97-100.
11. Isachenko V., Alabart J. L., Dattena M., Nawroth F., Cappai P., Isachenko E., Cocero M. J., Olivera J., Roche A., Accardo C., Krivokharchenko A., Folch J.: New technology for vitrification and field (microscope free) warming and transfer of small ruminants embryos. *Theriogenology* 2003, 59, 1209-1218.
12. Leoni G., Bogliolo L., Berlinguer F., Rosati L., Pintus P. P., Ledda S., Naitana S.: Defined media for vitrification, warming, and rehydration: effects on post-thaw protein synthesis and viability of *in vitro* derived ovine embryos. *Cryobiology* 2002, 45, 204-212.
13. Martinez A. G., Matkovic M.: Cryopreservation of ovine embryos: slow freezing and vitrification. *Theriogenology* 1997, 49, 1039-1049.
14. McGinnis L. K., Youngs C. R.: Vitrification of ovine embryos. *Theriogenology* 1990, 33, 287.
15. Naitana S., Dattena M., Gallus M., Loi P., Branca A., Ledda S., Cappai P.: Recipient synchronization affects viability of vitrified ovine blastocysts. *Theriogenology* 1995, 43, 1371-1378.
16. Naitana S., Ledda S., Loi P., Leoni G., Bogliolo L., Dattena M., Cappai P.: Polyvinyl alcohol as a defined substitute for serum in vitrification and warming solutions to cryopreserve ovine embryos at different stages of development. *Anim. Reprod. Sci.* 1997, 48, 247-256.
17. Papadopulos S., Rizos D., Duffy P., Wade M., Quinn K., Boland M., Lonergan P.: Embryo survival and recipient pregnancy rates after transfer of fresh or vitrified, *in vivo* or *in vitro* produced ovine blastocyst. *Anim. Reprod. Sci.* 2002, 74, 35-44.
18. Papis K.: Otwarte metody wtryfikacji i ich zastosowanie w kriokonserwacji oocytów i zarodków ssaków. *Medycyna Wet.* 2001, 57, 547-551.
19. 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.
20. Papis K., Shimizu M., Izaike Y.: A highly efficient modified vitrification method for Day 3 *in vitro* produced bovine embryos. *Cryo-Lett.* 1999, 20, 203-206.
21. Papis K., Wenta Muchalska E.: Innocuous vitrification of day 3 bovine embryos enables a second cryopreservation of resulting blastocysts at day 7. 14<sup>th</sup> Internat. Congress Anim. Reprod. Stockholm 2000, 2, p. 167.
22. Paz P. de, Sanchez A. J., Fernandez J. G., Carbaño M., Dominguez J. C., Camorro C. A., Anel L.: Sheep embryo cryopreservation by vitrification and conventional freezing. *Theriogenology* 1994, 42, 327-338.
23. Ptak G., Dattena M., Loi P., Tischner M., Cappai P.: Ovum pick-up in sheep: efficiency of *in vitro* production, vitrification and birth of offspring. *Theriogenology* 1999, 52, 1105-1114.
24. Rall W. F., Fahy G. M.: Ice-free cryopreservation of mouse embryos at -196°C by vitrification. *Nature* 1985, 313, 573-575.
25. Scheffen 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.
26. Schiewe M. C., Rall W. F., Stuart L. D., Wildt D. E.: Analysis of cryoprotectant, cooling rate and *in situ* dilution using conventional freezing or vitrification for cryopreserving sheep embryos. *Theriogenology* 1991, 36, 279-293.
27. Schiewe M. C., Rall W. F., Stuart L. D., Wildt D. E.: *In situ* straw dilution of ovine embryos cryopreserved by conventional freezing or vitrification. *Theriogenology* 1990, 33, 321.
28. Seidel G. E.: Modifying oocytes and embryos to improve their cryopreservation. *Theriogenology* 2006, 65, 228-235.
29. Smorag Z., Wierzbowski S., Wierchoś E., Karetta W., Gajda B.: Wyniki transplantacji zamrożonych zarodków owcy. *Medycyna Wet.* 1977, 33, 552-554.
30. Smorag Z., Wierzbowski S., Wierchoś E., Laszczka A., Gajda B.: Transplantation von tiefgefrorenen Schafembryonen. *Arch. Exp. Vet. Med.* 1982, 36, 163-167.
31. Szell A. Z., Windsor D. P.: Survival of vitrified sheep embryos *in vitro* and *in vivo*. *Theriogenology* 1994, 42, 881-889.
32. Szell A., Zhang J., Hudson R.: Rapid cryopreservation of sheep embryos by direct transfer into liquid nitrogen vapour at -196°C. *Reprod. Fertil. Dev.* 1990, 2, 613-618.
33. Traldi A. S., Leboeuf B., Cagnie Y., Poulin N., Mermillod P.: Comparative results of *in vitro* and *in vivo* survival of vitrified *in vitro* produced goat and sheep embryos. *Theriogenology* 1999, 51, 175.
34. 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. *Cryo-Lett.* 1997, 18, 191-195.
35. Vajta G., Holm P., Kuwayama M., Booth P. J., Jacobsen H., Greve T., Callesen H.: Open pull straw (OPS) vitrification: a new way to reduce cryoinjuries of bovine ova and embryos. *Mol. Reprod. Dev.* 1998, 51, 53-58.
36. Walmsley S. E., Pollard J. W., Randall A. E., Morris L. H. A.: Survival of *in vitro* produced ovine embryos of different developmental stages after vitrification in EFS-40. *Theriogenology* 1999, 51, 177.
37. Whittingham D. G.: Embryo banks in the future of developmental genetics. *Genetics* 1974, 78 (Suppl), 395-402.
38. Willadsen S. M., Polge C., Rowson L. E. A., Moor R. M.: Deep freezing of sheep embryos. *J. Reprod. Fertil.* 1976, 46, 151-154.
39. Zhu S. E., Zeng S. M., Yu W. L., Li S. J., Zhang Z. C., Chen Y. F.: Vitrification of *in vivo* and *in vitro* produced ovine blastocysts. *Anim. Biotechnol.* 2001, 12, 193-203.