



## Pozaustrojowe uzyskiwanie zarodków bydłęcych – technologia i zastosowanie praktyczne

Lucyna Kątska-Książkiewicz

Zakład Fizjologii Rozrodu Zwierząt, Instytut Zootechniki  
Balice k. Krakowa

### *In vitro* embryo production in cattle – technology and practical application

#### Summary

Technology of bovine *in vitro* embryo production (IVP) had developed during the last few years to the level which allows its practical applications. Recently, IVP technology has been commercially used in several countries to increase the number of calves originating from donors of high genetic value. Combined with ovum pick-up technique (OPU), IVP technology serves as an alternative or integral method in breeding program MOET. The technology of IVP includes three developmental steps, i.e. oocyte *in vitro* maturation, *in vitro* fertilization and embryo culture. This review will focus on immature bovine oocyte recovery and selection, *in vitro* maturation, sperm processing, embryo culture to hatched blastocysts stage and factors affecting IVF efficiency. Moreover, recently developed investigations (IVP using calf oocytes and oocytes originating from small ovarian follicles) aiming to increase the effectiveness of IVP technology are discussed as well.

#### Key words:

cattle, IVM, IVF, IVC, oocyte recovery, embryo quality.

#### Adres do korespondencji

Lucyna  
Kątska-Książkiewicz,  
Zakład Fizjologii Rozrodu  
Zwierząt,  
Instytut Zootechniki,  
32-083 Balice k. Krakowa.

---

#### biotechnologia

1 (64) 32–42 2004

Dotychczas opracowano metody uzyskiwania *in vitro* zarodków u ponad 20 gatunków ssaków, uzyskując potomstwo zwierząt laboratoryjnych i gospodarskich, a także dziko żyjących, w tym gatunków ginących i zagrożonych. Mimo niewątpliwego

postępu, najbardziej widocznego w przypadku zapłodnienia *in vitro* oocytów ludzkich, a potwierdzonego urodzeniem się już ponad miliona dzieci, efektywność metody, w przypadku zwierząt gospodarskich, nie jest jeszcze w pełni zadowalająca.

Badania nad uzyskiwaniem zarodków *in vitro* w odniesieniu do zwierząt gospodarskich są najbardziej zaawansowane u bydła, co jest zrozumiałe ze względu na znaczenie użytkowe tych zwierząt. Już w 1982 r. uzyskano pierwsze cielę po transplantacji zarodka z zapłodnienia *in vitro* (1), poddając zapłodnieniu oocyty dojrzewające *in vivo*. Pierwsze cielęta, pochodzące z zarodków wyprodukowanych przy użyciu kompleksowej metody *in vitro* urodziły się w 1988 r. w Irlandii (2), a w Polsce w 1990 r. (3). Technologia pozaustrojowej produkcji zarodków bydłych (IVP), opracowana w ciągu ostatnich kilkunastu lat w stopniu pozwalającym na jej praktyczne stosowanie, jest obecnie z powodzeniem wykorzystywana w wielu krajach dla zwiększenia liczby potomstwa dawczyń cennych pod względem genetycznym. W połączeniu z techniką przyżyciowego pobierania oocytów (OPU), technologia IVP służy jako alternatywna lub integralna metoda programów hodowlanych MOET (*Multiple Ovulation and Embryo Transfer*).

Technologia IVP obejmuje trzy biologiczne etapy: uzyskiwanie i dojrzewanie *in vitro* oocytów, zapłodnienie *in vitro* oraz hodowlę zarodków.

## 1. Uzyskiwanie, ocena jakościowa i dojrzewanie *in vitro* oocytów bydłych

Oocyty przeznaczone do dojrzewania *in vitro* pobierane są poubojowo lub przyżyciowo. Poubojowe pobieranie oocytów z pęcherzyków antralnych (o średnicy > 2 mm) może być wykonane poprzez: 1) aspirację zawartości pęcherzyka za pomocą strzykawki zaopatrzonej w igłę; 2) izolację pęcherzyków poprzez wycięcie z kory jajnika przy użyciu nożyczek, a następnie rozrywanie pęcherzyków w pożywce, pod kontrolą mikroskopu stereoskopowego lub 3) nacinanie powierzchni jajnika po uprzednim umieszczeniu w płynie do manipulacji.

Prezentowane metody różnią się wydajnością odzysku oocytów. Aspiracja płynu pęcherzykowego wraz z zawartym w pęcherzyku oocytom jest stosunkowo prostym sposobem pobierania, pozwalającym na uzyskanie od 30 do 60% oocytów w stosunku do liczby użytych do aspiracji pęcherzyków (4,5). Ta metoda uzysku może być stosowana zarówno poubojowo jak i przyżyciowo, pod kontrolą USG (6,7). Efektywność pobierania oocytów z pęcherzyków można zwiększyć stosując metodę rozrywania izolowanych pęcherzyków pod kontrolą mikroskopu stereoskopowego (4,5). Tą metodą można uzyskać praktycznie wszystkie oocyty zawarte w izolowanych pęcherzykach. Jednakże duża pracochłonność omawianej metody ogranicza jej przydatność. W przypadku cennego materiału genetycznego lub też dysponowania niewielką liczbą jajników, ten sposób izolacji pęcherzyków wraz z ich rozrywaniem jest szczególnie zalecany. Trzecia metoda uzyskiwania oocytów, polegająca na naci-

niu powierzchni jajnika, pozwala uzyskać około dwukrotnie więcej oocytów niż przez aspirację. Mankamentem tej metody jest, że uzyskane tym sposobem oocyty pochodzą z pęcherzyków różnej wielkości, a zatem również z bardzo małych pęcherzyków antralnych o ograniczonych możliwościach rozwojowych. Dlatego konieczna jest dodatkowa staranna selekcja eliminująca oocyty, które nie osiągnęły wymaganej wielkości.

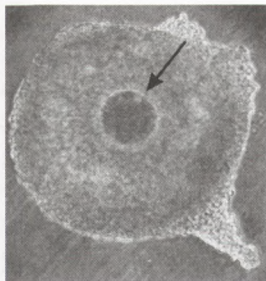
Obecnie, coraz powszechniej stosuje się przyżyciową metodę uzyskiwania niedojrzałych oocytów, pozwalającą na wielokrotne ich pobieranie z jajnika tej samej dawczyni. Technika ta, określana jako OPU (*ovum pick-up*) polega na aspiracji oocytów z pęcherzyków jajnikowych pod kontrolą USG, z zastosowaniem dopochwowej sondy sprężonej z igłą. Technika transwaginalnej aspiracji pozwala na uzyskanie około 50% oocytów w stosunku do liczby aspirowanych pęcherzyków (6,7). Zabieg ten można powtarzać dwukrotnie w ciągu jednego tygodnia, przez okres nawet kilku miesięcy. W rezultacie można uzyskać od jałówki w ciągu jednego tygodnia nawet 13 przydatnych do hodowli oocytów (6).

Pobrane oocyty poddaje się starannej selekcji. Kryteriami oceny morfologicznej niedojrzałego oocytu są obecność i stan komórek wzgórka jajonośnego oraz wygląd cytoplazmy (4,5). Niedojrzały oocyt, określany jako morfologicznie prawidłowy, powinien być otoczony spoiwą warstwą komórek wzgórka jajonośnego i posiadać cytoplazmę jednolicie granulowaną, bez zmian morfologicznych (fot. 1). Natomiast oocyty z oznakami degeneracji cytoplazmy, ze zmianami w komórkach wzgórka jajonośnego, jak rozproszenie, grudkowatość, zmniejszenie liczby warstw czy też całkowity ich brak, świadczą o zaawansowanej atrezji i nie nadają się do hodowli *in vitro* (fot. 2).

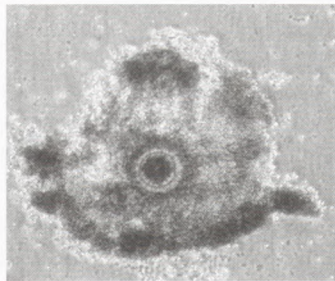
Odmienne są kryteria oceny dojrzałych oocytów (fot. 3). Wskaźnikiem dojrzałości oocytu jest obecność w przestrzeni okołoołtkowej I ciała kierunkowego. Jednakże jego obecność można stwierdzić dopiero po usunięciu komórek ziarnistych (fot. 4).

W odpowiednich warunkach hodowli większość oocytów podejmuje mejozę (3,4) i około 90% z nich osiąga stadium metafazy II (fot. 5). Warunkiem wystąpienia dojrzewania *in vitro* jest stworzenie oocytom środowiska zbliżonego do warunków *in vivo*, poprzez dobór odpowiedniego składu pożywki, pH, osmolarności, składu mieszanki gazowej, temperatury, czasu, w którym przeprowadza się hodowlę i przestrzegania warunków uzyskiwania i selekcji materiału.

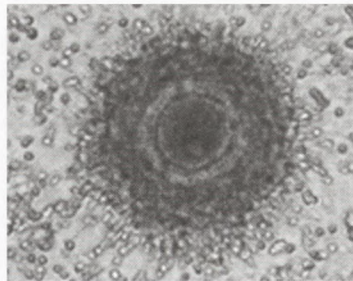
Pożywki stosowane do hodowli oocytów są oparte na gotowych płynach o określonym składzie chemicznym. Najczęściej używana jest pożywka TCM 199, zawierająca zmodyfikowany roztwór soli Earla, wiele aminokwasów, glutaminę i wodorowęglan sodu jako czynnik buforujący. Pożywkę uzupełnia się cielęcą surowicą płodową (FCS) lub surowicą rujową (ECS). Często dodaje się do pożywki związki energetyczne takie jak pirogronian sodu i mleczan sodu, oraz antyoksydanty jak np. kwas askorbinowy (8). Dojrzewanie oocytów można również przeprowadzić w pożywce nie zawierającej surowicy, która będzie uzupełniona czynnikami wzrostu



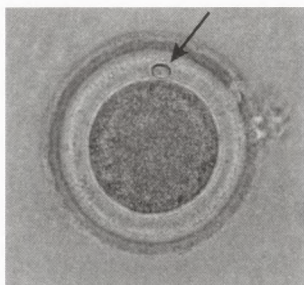
Fot. 1



Fot. 2



Fot. 3



Fot. 4



Fot. 5

Fot. 1. Niedojrzały oocyt bydłęcy o prawidłowym wyglądzie morfologicznym, otoczony ścisłą i spolistą warstwą komórek wzgórka jajonośnego. Strzałka wskazuje jądro oocyty w stadium GV – przejście w cytoplazmie oocyty (pow. 200×).

Fot. 2. Niedojrzały, oocyt bydłęcy z wyraźnymi zmianami atretycznymi, grudkowatość i częściowe rozproszenie komórek wzgórka jajonośnego (pow. 100×).

Fot. 3. Oocyt bydłęcy po 20 godzinach dojrzewania *in vitro*, otoczony rozproszoną warstwą komórek wzgórka jajonośnego, natomiast komórki wieńca promienistego jeszcze nie uległy rozproszeniu (pow. 200×).

Fot. 4. Oocyt bydłęcy dojrzały *in vitro* z widocznym I ciałkiem kierunkowym wskazanym strzałką; otaczające komórki wzgórka jajonośnego i korony promienistej zostały mechanicznie usunięte (pow. 200×).

Fot. 5. Oocyt bydłęcy w stadium metafazy II. Strzałka wskazuje chromosomy ciała kierunkowego (pow. 1000×).

(TGF- $\alpha$ , transformujący czynnik wzrostu oraz EGF – nabłonkowy czynnik wzrostu) wywołującymi ekspansję komórek wzgórka jajonośnego i pozytywnie wpływającymi na zdolności rozwojowe zarodków po zapłodnieniu *in vitro* (9,10). Dojrzewanie oocytów prowadzi się najczęściej w atmosferze 5% CO<sub>2</sub> w powietrzu, przy maksymalnej wilgotności.

## 2. Zapłodnienie *in vitro*

Do pozaustrojowego zapłodnienia (IVF) oocytów używa się plemników uprzednio uzdatnionych, tj. kapacytowanych. W warunkach fizjologicznych kapacytacja zachodzi w drogach rodnych samicy przygotowując plemnik do egzocytozy akrosomu i nabycia zdolności zapładniających (5,11).

Do zapłodnienia *in vitro* u bydła najczęściej używane jest mrożone nasienie pobrane od wyselekcjonowanych buhajów. Wstępnym kryterium, jakie powinno być spełnione, aby nasienie mrożone mogło zostać użyte do zapłodnienia *in vitro*, jest ruchliwość po rozmrożeniu, wynosząca powyżej 50% ruchu postępowego. Kryterium to jest koniecznym, lecz nie wystarczającym wskaźnikiem przydatności nasienia; ostatecznym wskaźnikiem są wyniki zapłodnienia pozaustrojowego przy użyciu testowanego nasienia.

Bezpośrednio po rozmrożeniu nasienia, zawiesinę plemników poddaje się rozdziałowi przy użyciu techniki podpływania (*swim-up*) lub poprzez wirowanie w gradiencie Percoll'u. Postępowanie to ma na celu eliminację plemników uszkodzonych w procesie mrożenia. Następnie zawiesinę plemników zagęszcza się poprzez wirowanie i określa się ich koncentrację. Zapłodnienie *in vitro* przeprowadza się w małych kroplach pożywki, gdzie umieszcza się dojrzałe *in vitro* oocyty dodając kapacytowane plemniki. Optymalna koncentracja plemników powinna być określana indywidualnie dla każdego buhaja; najczęściej mieści się w granicach od 1 do  $1,5 \times 10^6$  /ml pożywki. Wspólna inkubacja gamet odbywa się w temp. 38,5°C, w obecności 5% CO<sub>2</sub> w powietrzu, przy maksymalnej wilgotności, w czasie od 20 do 24 godz. Po tym czasie potencjalne zygoty są oczyszczane z przylegających plemników i umieszczane w hodowli.

O wyniku zapłodnienia *in vitro* decyduje wiele czynników, z których za najbardziej istotny uznaje się wpływ buhaja, a ściślej – zróżnicowaną podatność na kapacytację jego nasienia. Oznacza to konieczność selekcji buhajów, czy nawet ejakulatów przeznaczanych do zapłodnienia pozaustrojowego. Z przeprowadzonych przez nas badań wynika, że usunięcie osocza z nasienia, a zatem eliminacja czynników dekapacytujących, oddziałuje korzystnie na przebieg kapacytacji *in vitro*, a w konsekwencji prowadzi do wzrostu odsetka dzielących się zarodków oraz zarodków osiągających stadium blastocysty (12).

## 3. Hodowla zarodków

Hodowla zarodków ssaków wymaga stworzenia warunków, w których wystąpią kolejne podziały mitotyczne (fot. 6-13), prowadzące do utworzenia blastocysty, najbardziej zaawansowanego, przedimplantacyjnego stadium rozwoju (fot. 10-13). W stadium tym obserwuje się pierwsze przejawy zróżnicowania komórek zarodka na dwie odrębne linie komórkowe – węzeł zarodkowy i trofoblast (fot. 11-13). Sta-

dium blastocysty jest istotnym wskaźnikiem zdolności rozwojowych zarodka, jednakże ostatecznym kryterium jest jego rozwój *in vivo*, po przeniesieniu do dróg rodnych zsynchronizowanej samicy-biorczyni (5).

Przełomem w hodowli zarodków ssaków *in vitro* było zastosowanie współhodowli z komórkami somatycznymi (3,5,13). Istotą tej metody była hipoteza, że komórki somatyczne w hodowli pierwotnej przejawiają funkcję podobną do tej, jaką wykazują te same komórki *in vivo*. Dostarczają one dzielącym się zarodkom potrzebnych metabolitów i swoistych stymulatorów wzrostu. Mogą też spełniać rolę odtruwającą, inaktywującą substancje toksyczne, produkty metabolizmu komórek w hodowli. Takim toksycznym metabolitem, powstającym jako końcowy produkt metabolizmu aminokwasów okazał się jon amonowy,  $\text{NH}_4$ .

Od kilku lat, w przypadku zarodków bydłych najczęściej stosuje się współhodowlę z dostępnymi w handlu (European Collection of Cell Cultures, Salisbury, GB) liniami komórek wątroby szczura (BRL), komórek nerki małpy zielonej (VERO) lub obydwoma liniami komórek równocześnie (5,14). Komórki te można wielokrotnie pasażować i zamrażać, bez uszczerbku ich zdolności wspomagania rozwoju zarodków. Zaletą używania kriokonserwowanych linii komórkowych jest standaryzacja warunków hodowli. Podobne warunki spełnia współhodowla z kriokonserwowanymi komórkami nabłonka jajowodowego, których jednak nie można pasażować. Komórki BRL syntetyzują i wydzielają LIF (*leucemia inhibitory factor*, czynnik przeciwbiałaczkowy) oraz inne biologicznie aktywne substancje zwiększające zdolności rozwojowe zarodków.

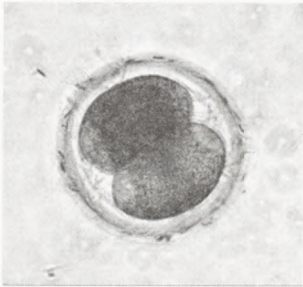
Zastosowanie współhodowli zarodków z komórkami somatycznymi zdecydowanie poprawia ich zdolności rozwojowe, jednakże uważa się, że taki system hodowli nie jest w pełni zdefiniowany i uniemożliwia badanie fizjologii zarodka. W celu ominięcia tej trudności opracowano metody hodowli, od stadium zygoty do blastocysty, w samej pożywce, bez komórek somatycznych, a nawet bez dodatku surowicy. Wyniki prac prowadzonych przez firmy biotechnologiczne, oferujące zarodki uzyskane metodami *in vitro* wskazują jednak, że jakość zarodków rozwijających się we współhodowli z komórkami somatycznymi jest zdecydowanie lepsza niż w innych systemach hodowli, co przekłada się na większą liczbę cieląt pozyskanych z tych zarodków.

Z badań porównawczych nad rozwojem *in vitro* zygot bydłych w różnych systemach hodowli wynika, że pożywka SOF (ang. *Syntetic Oviductal Fluid*), syntetyczny płyn jajowodowy, uzupełniona surowicą lub aminokwasami, może być z powodzeniem stosowana w hodowli zygot (15-17). W tej chemicznie zdefiniowanej pożywce można badać procesy i mechanizmy rozwoju wczesnych zarodków, które mogą być maskowane obecnością nieznanymi czynnikami obecnymi w surowicy lub czynnikami wydzielanymi przez komórki somatyczne. Uważa się, że dodatek surowicy do pożywki może powodować komórkowe i molekularne zaburzenia w rozwoju określane jako syndrom dużego potomstwa (duża masa urodzeniowa, przedłużenie okresu ciąży, wzrost odsetka poronień i śmiertelności płodów).

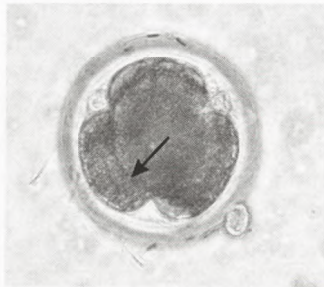
Obecnie opracowano nową, wieloskładnikową pożywkę zawierającą zmodyfikowany płyn TCM 199 (pozbawiony glukozy, Tween-80 i kwasu paraaminobenzoeso-

wego), czynniki wzrostu, taurynę, selen, apotransferynę, pirogronian i mleczan sodu (18), która umożliwia rozwój zarodków bydłęcych z efektywnością porównywalną do rezultatów współhodowli z komórkami somatycznymi (9).

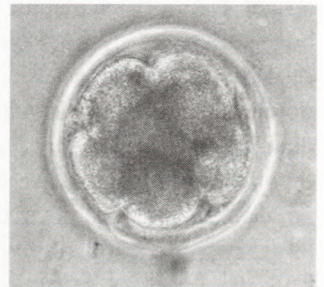
Hodowlę zarodków przeprowadza się w atmosferze 5% CO<sub>2</sub> w powietrzu lub w mieszance gazowej o składzie 5% O<sub>2</sub> + 5% CO<sub>2</sub> + 90% N<sub>2</sub>. Korzystniejszym wariantem dla monokultury zarodków bydłęcych jest mieszanka gazowa o zredukowanej zawartości tlenu.



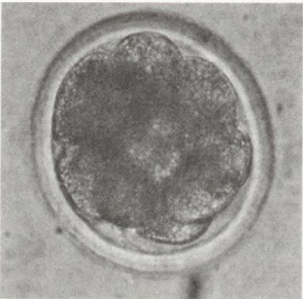
Fot. 6



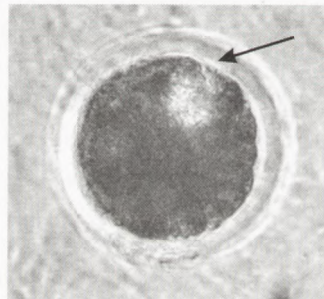
Fot. 7



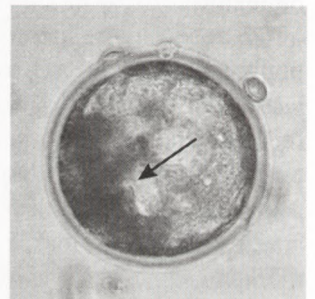
Fot. 8



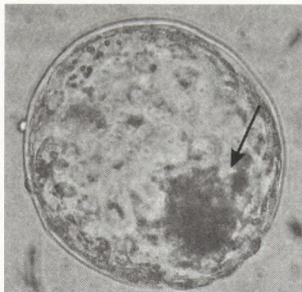
Fot. 9



Fot. 10



Fot. 11



Fot. 12



Fot. 13

#### 4. Obecne możliwości metody IVP u bydła

Stało się już możliwe uzyskiwanie znacznej liczby wyprodukowanych *in vitro* zarodków, jednakże efektywność poszczególnych etapów metody jest znacznie zróżnicowana. W wyniku hodowli *in vitro* ponad 90% oocytów osiąga dojrzałość, a ponad 80% ulega zapłodnieniu *in vitro*. Ponad 70% użytych do zapłodnienia oocytów podejmuje podziały zarodkowe, jednakże odsetek zapłodnionych oocytów osiągających w kompletnym systemie *in vitro* stadium blastocysty nie przekracza na ogół 40%. Obserwuje się znaczne rozbieżności wyników osiąganych nie tylko przez poszczególne zespoły badawcze, lecz nawet pomiędzy poszczególnymi doświadczeniami. Wynikają one, m.in. ze zróżnicowania w podatności plemników na kapacytację *in vitro*, które stwierdzono nie tylko pomiędzy poszczególnymi osobnikami, lecz nawet kolejnymi ejakulatami pozyskiwanymi od tego samego buhaja. Stwierdzono również znaczne różnice między zarodkami uzyskanymi *in vitro* i *in vivo* (w morfologii, tempie rozwoju, metabolizmie zarodka, ekspresji genów, podatności na kriokonserwację). Wspomniano już, że jednym z istotnych problemów pojawiających się w czasie rozwoju *in vivo* zarodków wyprodukowanych metodami laboratoryjnymi stanowi syndrom dużego potomstwa (LOS – *large offspring syndrom*) u bydła i owiec. Jest on rezultatem komórkowych i molekularnych zaburzeń w rozwoju. Jednakże, mimo wspomnianych ograniczeń, metoda pozaustrojowego uzyskiwania zarodków bydłych stosowana jest już na znaczną skalę w celach komercyjnych (tab. 1,2).

Fot. 6. Zarodek bydłcy w stadium 2-komórkowym, po około 26 godzinach od zapłodnienia *in vitro*. Do osłonki przejrzystej przylegają plemniki (pow. 200×).

Fot. 7. Zarodek bydłcy w stadium 4-komórkowym po około 48 godzinach od zapłodnienia *in vitro* (pow. 200×).

Fot. 8. Zarodek bydłcy w stadium 8-komórkowym po około 52 godzinach od zapłodnienia *in vitro* (pow. 200×).

Fot. 9. Zarodek bydłcy w stadium 12-komórkowym po około 90 godzinach od zapłodnienia *in vitro* (pow. 200×).

Fot. 10. Zarodek bydłcy w stadium wczesnej blastocysty, po 7 dniach od zapłodnienia *in vitro*, współhodowla z komórkami Vero (pow. 200×).

Fot. 11. Zarodek bydłcy w stadium późnej blastocysty, po 8 dniach od zapłodnienia *in vitro*, strzałka wskazuje węzeł zarodkowy. Do osłonki przejrzystej przylegają komórki Vero pochodzące ze współhodowli (pow. 200×).

Fot. 12. Wylęgająca się blastocysta bydłca w 9 dniu od zapłodnienia *in vitro*. Strzałka wskazuje węzeł zarodkowy (pow. 400×).

Fot. 13. Wylęgła blastocysta bydłca w 10 dniu od zapłodnienia *in vitro*. Strzałka wskazuje węzeł zarodkowy (pow. 400×).





Tabela 1

**Komercyjne transplantacje wyprodukowanych *in vitro* zarodków (dane wg International Embryo Transfer Society za rok 2000)**

Kraj	Wyprodukowane zarodki	Transplantowane świeże	Transplantowane po mrożeniu	Ogółem
Afryka	975	1	21	22
Azja	97 011	6 680	5 684	12 364
USA	1 741	1 382	533	1 915
Ameryka Płd.	12 667	12 527		12 527
Europa	26 520	6 377	7 426	13 803
Oceania	1 358	930	130	1 060
Ogółem	139 372	27 967	13 794	41 761

Tabela 2

**Transplantacje zarodków w Europie w 2001 r (dane wg AETE – Europejskiego Towarzystwa Przenoszenia Zarodków)**

Pochodzenie zarodków	Liczba bioczyń
rozwijające się <i>in vivo</i>	94 603
wyprodukowane <i>in vitro</i>	8 972
ogółem	107 342
odsetek transplantowanych zarodków z wyprodukowanych <i>in vitro</i>	8,66%
transplantacje mrożonych/rozmrzanych zarodków	52,7%

## 5. Produkcja zarodków z oocytów uzyskiwanych od cieląt

Podjęmowane próby wykorzystania cieląt jako dawczyń oocytów do technologii IVP mają na celu skrócenie odstępu między pokoleniami, a tym samym przyspieszenie postępu hodowlanego. Doniesienia dotyczące zdolności rozwojowych oocytów cieląt są kontrowersyjne. Można zakładać, że obserwowane rozbieżności wyników są uwarunkowane takimi czynnikami jak wiek cielęcia, wielkość: jajnika, pęcherzyka jajnikowego, dawka hormonów (FSH, estradiol) w pożywce do dojrzewania oocytów (19-21).

Generalnie, efektywność metody IVP przy użyciu oocytów cieląt jest istotnie niższa (różnice nawet do 50%) w porównaniu do standardowej metody IVP, a koszt uzyskania zarodka jest zdecydowanie wyższy.

## 6. Wykorzystanie do IVP oocytów z małych pęcherzyków

W jajnikach krwi zawarte jest około 120 000 małych, nierosnących i rosących pęcherzyków, z których w ciągu życia osobniczego ponad 99% ginie w wyniku atrezji, a tylko 0,05% owuluje (22). Opracowanie efektywnych metod długoterminowej

hodowli rosnących *in vitro* oocytów pochodzących z małych pęcherzyków jajnikowych, które pozwalałyby na uzyskiwanie fizjologicznie prawidłowych, w pełni dojrzałych gamet żeńskich, stwarzałyby możliwość maksymalnego wykorzystania potencjału rozrodczego samicy dostarczając dużą liczbę gamet żeńskich. Prace nad uzyskiwaniem i hodowlą pęcherzyków przedantralnych przeprowadzone na myszach i szczurach doprowadziły do opracowania metod wzrostu i dojrzewania pęcherzyków, ich owulacji *in vitro*, a także do uzyskania potomstwa po zapłodnieniu *in vitro* oocytów otrzymanych z hodowanych *in vitro* pęcherzyków przedantralnych, a nawet pierwotnych (23). Te pozytywne rezultaty uzyskane u gryzoni inspirują do prowadzenia badań nad opracowaniem metod hodowli pęcherzyków przedantralnych z jajników zwierząt gospodarskich, a zwłaszcza bydła. Mimo licznych badań prowadzonych w wielu ośrodkach naukowych, jak dotychczas nie udało się opracować efektywnych metod hodowli takich oocytów. Uzyskano wprawdzie pierwsze cielę z rosnącego *in vitro* oocytu bydłowego, który pobrano z pęcherzyka o średnicy około 0,7 mm (24), jednakże ten sukces był efektem wielu żmudnych doświadczeń. Aczkolwiek efektywność tej metody wynosiła poniżej 4%, jednakże są to obiecujące rezultaty i zachęcają do kontynuacji badań, mimo że droga do opanowania metody, jest jeszcze, jak się wydaje, odległa i skomplikowana. Metoda hodowli pęcherzyków wczesnych stadiów rozwojowych w połączeniu z technikami już stosunkowo dobrze opanowanymi, tj. kompleksową metodą pozaustrojowej produkcji zarodków, pozwalałaby na dużo większe niż obecnie wykorzystanie potencjału gametotwórczego jajników, stając się źródłem dużej liczby gamet czy zarodków. Jest to istotne zarówno dla praktyki hodowlanej, jak też dla rozwoju biotechnologii rozrodu zwierząt.

## Literatura

1. Brackett B. G., Bousquet D., Boice M. L., Donawick W. J., Evans J. F., Dressel M. A., (1982), Biol. Reprod., 27, 147-158.
2. Lu K. H., Gordon I., Chen H. B., Gallagher M., McGovern H., (1988), Vet. Rec., 122, 539-540.
3. Kątska L., (1991), *Zapłodnienie in vitro dojrzałych in vivo i in vitro oocytów bydłych*. Rozprawa habilitacyjna, Wyd. własne IZ, Kraków.
4. Kątska L., (1985), Roczn. Nauk. Zoot., Monogr. Rozpr., 23, 83-116.
5. Kątska L., (1997), *Biotechnologia zwierząt*, red. L. Zwierzchowski, K. Jaszczak, J. M. Modliński, Wyd. Naukowe PWN, Warszawa, 431-471.
6. Kruij Th. A. M., Boni R., (1994), Proc. Eur. Confer. Embryo Techn. & Genet. Engin. In Cattle & Sheep, 117-126.
7. Smorąg Z., Gogol P., Kątska L., Jażdżewski J., (1999), Medycyna Wet., 55, 317-320.
8. Guerin P., El Moutassim S., Menezo Y., (2001), Hum. Update, 7, 175-189.
9. Hoshi H., (2003), Theriogenology, 59, 675-685.
10. Abe H., Yamashita S., Satoh T., Hoshi H., (2002), Mol. Reprod. Dev., 61, 57-66.
11. Kątska L., (2000), Medycyna Wet., 56, 372-375.
12. Kątska L., Ryńska B., Smorąg Z., (1996), Anim. Reprod. Sci., 44, 23-31.
13. Eyston W. H., First N. L., (1989), J. Reprod. Fertil., 85, 715-720.
14. Duszewska A. M., Reklewski Z., Pieńkowski M., Karasiewicz J., Modliński J. A., (2000), Theriogenology, 54, 1239-1247.

15. Trounson A., Pushett D., Maclellan L. J., Lewis I., Gardner D. K., (1994), *Theriogenology*, 41, 57-66.
16. Kątska L., Ryńska B., Smoraż Z., (1995), *Theriogenology*, 43, 859-870.
17. Walker S. K., Heard T. M., Seamark R. F., (1992), *Theriogenology*, 37, 111-126.
18. Yamashita S., Abe H., Itoh T., Satoh T., Hoshi H., (1999), *Cytotechnology*, 31, 1-9.
19. Torner H., Alm H., Goristanov I., (1992), 12<sup>th</sup> Intern. Congr. Anim. Reprod., 1, 381-383.
20. Khatir H., Lonergan P., Carolan C., Mermillod P., (1996), *Mol. Reprod. Dev.*, 45, 231-239.
21. Gandolfi F., Milanesi E., Pocar P., Luciano A. M., Brevini T. A., Acocella F., Lauria A., Armstrong D. T., (1998), *Mol. Reprod. Dev.*, 49, 168-175.
22. Erickson B. H., (1966), *J. Anim. Sci.*, 25, 800-805.
23. Eppig J. J., O'Brien M. J., (1996), *Biol. Reprod.*, 54, 197-207.
24. Yamamoto K., Otoi T., Koyama N., Horikita N., Tachikawa S., Miyano T., (1999), *Theriogenology*, 52, 81-89.