

# Czynniki warunkujące ilość i jakość zarodków uzyskiwanych przy użyciu kompleksowej metody *in vitro* u bydła

Lucyna Kątska  
Zakład Fizjologii Rozrodu Zwierząt  
Instytut Zootechniki  
Balice k. Krakowa

## 1. Wstęp

Jednym z czynników ograniczających produkcję oraz postęp hodowlany u bydła jest stosunkowo niska rozrodczość samic. Obecnie istnieją dwie technologie pozwalające zwiększyć liczbę zarodków, a w konsekwencji potomstwa u bydła. Jedną z nich jest uzyskiwanie zarodków w warunkach *in vivo*, które obejmuje hormonalne wywoływanie mnogich owulacji (MO), sztuczne unasienianie (AI), niechirurgiczne wyflukiwanie zarodków i ich przenoszenie do dróg rodnych zsynchronizowanych biorczyń (ET) — technologia ta znalazła zastosowanie praktyczne w programach hodowlanych MOET. Drugim sposobem jest uzyskiwanie zarodków przy użyciu kompleksowej metody *in vitro* (IVP). Ta technologia obejmuje uzyskiwanie i dojrzewanie oocytów *in vitro*, zapłodnienie *in vitro* oraz hodowlę zarodków *in vitro*. Prowadzone w ostatnim dziesięcioleciu badania przyczyniły się do jej znacznego udoskonalenia. Obecnie istnieje możliwość uzyskania w wyniku dojrzewania *in vitro* ponad 90% oocytów w stadium metafazy II, po zapłodnieniu *in vitro* 70 do 80% rozwijających się zarodków, z których około 50% osiąga stadium blastocysty. Mimo postępu w rozwoju tej technologii, kontynuowane są badania, w których zmierza się do poprawy jakości zarodków wyprodukowanych *in vitro*. Obserwuje się bowiem znaczne różnice między zarodkami uzyskanymi w efekcie dojrzewania *in vivo* i *in vitro*. Zarodki dojrzewające *in vivo* wykazują zdecydowanie wyższy potencjał rozwojowy. Biorąc pod uwagę, że stadium metafazy II, a zatem dojrzałość jądra, osiąga podobny odsetek oocytów dojrzewających *in vivo* i *in vitro*, można przypuszczać, że istniejące różnice są konsekwencją różnic w dojrzałości cytoplazmy. Stwierdza się również różnice w ilości i jakości zarodków uzyskiwanych w kolejnych powtórzeniach tego samego doświadczenia. Mogą one wynikać z trzech zasadniczych przyczyn, a mianowicie: z jakości oocytów; ze zróżnicowanej zdolności zapładniającej nasienia buhajów czy też z warunków hodowli.

Celem opracowania jest określenie roli niektórych czynników warunkujących efektywność technologii IVP u bydła, a zatem ilość i jakość uzyskiwanych zarodków.

## 2. Uzyskiwanie i dojrzewanie *in vitro* oocytów

Zdecydowana większość oocytów jajnikowych zawarta jest w puli pęcherzyków pierwotnych o średnicy poniżej 0,06 mm. Pęcherzyki te w sposób ciągły opuszczają wspomnianą pulę rozpoczynając wzrost. W konsekwencji „rekrutacji” pęcherzyków pierwotnych do populacji pęcherzyków rosnących liczba pęcherzyków maleje wraz z wiekiem, a jajniki młodych zwierząt są znacznie bogatszym źródłem oocytów (15). Jednakże, liczba pęcherzyków antralnych (o średnicy > 2 mm) u krów starszych jest tylko nieznacznie niższa niż u jałówek czy krów młodszych. Do takiego wniosku doprowadziły porównawcze obserwacje liczby i jakości oocytów uzyskiwanych od bydła o zróżnicowanym wieku (35). Uzyskiwanie przydatnych do hodowli oocytów, również od zwierząt starszych, stwarza możliwość wykorzystania tych samic jako źródła oocytów, a w konsekwencji zarodków, co ma szczególne znaczenie w odniesieniu do bydła o znacznej wartości hodowlanej (45).

Podstawowym źródłem oocytów używanych w technologii IVP są pęcherzyki jajnikowe bydła rzeźnego. W badaniach zależności między wielkością pęcherzyka jajnikowego a zdolnością rozwojową oocytu wykazano, że rośnie ona wraz ze wzrostem wielkości pęcherzyka (10,47,53,54,64). Tak zatem, pęcherzyk musi osiągnąć średnicę minimum 3-4 mm aby zawarty w nim oocyt był zdolny do dojrzewania, zapłodnienia i podjęcia rozwoju zarodkowego. Te zdolności rozwojowe oocytu rosną (co wyraża się wzrostem odsetka rozwijających się zarodków) w miarę redukcji tempa wzrostu pęcherzyka, która następuje albo w momencie osiągnięcia statusu pęcherzyka dominującego, albo podczas wczesnej atrezji pęcherzyka. Sygnał zapoczątkowujący dojrzewanie oocytu, który dociera do pęcherzyka w czasie przedowulacyjnego wyrzutu LH, można wywołać w warunkach *in vitro* poprzez kilkugodzinna poubojową inkubację jajników w odpowiednich warunkach termicznych (9,10,61). Istnieje hipoteza, że oocyty pochodzące z pęcherzyków we wczesnej atrezji mogą reagować, podobnie jak oocyty z pęcherzyków przedowulacyjnych, a inkubacja w jajnikach przetrzymywanych w temperaturze około 35°C pozwala na ich prawidłowy rozwój po zapłodnieniu (10,61).

Podstawowe kryteria, które pozwalają odróżnić oocyty morfologicznie normalne (przydatne do hodowli *in vitro*) od atretycznych (nieprzydatnych) to obecność i stan otaczających oocyt komórek wzgórka jajonośnego oraz wygląd morfologiczny cytoplazmy oocytu (35). Niedojrzały, morfologicznie normalny oocyt powinien posiadać jednolicie granulowaną, bez zmian morfologicznych cytoplazmę i być otoczony ścisłą i spoistą warstwą komórek wzgórka. Obecność komórek wzgórka zapewnia: dostarczenie do oocytu związków energetycznych niezbędnych w procesie wzrostu, utworzenie osłonki przejrzystej, a także, po przedowulacyjnym wyrzucie LH, syntezę matrix, złożonej

z białek i kwasu hialuronowego, wspomagającej transport jajowodowy i penetrację plemników (5). Otaczające niedojrzały oocyt komórki wzgórka jajonośnego składają się z komórek wieńca promienistego (warstwa leżąca najbliżej osłonki przejrzystej i komunikująca się z oocytem poprzez wypustki cytoplazmatyczne) i zewnętrznej warstwy komórek wzgórka połączonych z komórkami wieńca promienistego poprzez złącza szczelinowe (13). Przeprowadzono szereg badań zmierzających do określenia zależności między morfologią komórek wzgórka a potencjałem rozwojowym oocytów i zarodków (10,13,23,29,46,60). Na ich podstawie można wnioskować, że szanse rozwojowe oocytów są tym większe im grubsza warstwa komórek wzgórka otacza niedojrzały oocyt, warstwą ścisłą i spoistą otoczone są oocyty pochodzące ze zdrowszych pęcherzyków, natomiast widoczne zmiany degeneracyjne w komórkach wzgórka świadczą o ich pochodzeniu z pęcherzyków o zaawansowanym procesie atrezji. Oocyty pochodzące z tych ostatnich wykazują najniższy potencjał rozwojowy (10,28). Niezbędność komórek wzgórka w procesie dojrzewania oocytów wykazano w doświadczeniach, w których oocyty mechanicznie pozbawiano otaczających je komórek (44,61).

Wspomniano już, że jajniki uzyskane poubojowo stanowią główne źródło oocytów używanych w badaniach nad pozaustrojowym uzyskiwaniem zarodków. Pobieranie oocytów można przeprowadzić poprzez: 1) aspirację zawartości pęcherzyka za pomocą strzykawki i igły; 2) rozrywanie izolowanych pęcherzyków; 3) nacinanie powierzchni jajnika przy użyciu skalpela czy żyłki (26,33).

Pierwsza z tych technik, tj. aspiracja jest najszerszej stosowaną, a z praktycznego punktu widzenia najwygodniejszą metodą. Pozwala bowiem na uzyskanie od 30 do 60% oocytów w stosunku do liczby aspirowanych pęcherzyków, a około 50% uzyskanych oocytów wykazuje normalny wygląd morfologiczny. Jeżeli dysponuje się dużą liczbą zwierząt/jajników, technika ta pozwala na stosunkowo szybkie pobranie dostatecznej ilości materiału.

Druga z omawianych technik pozwala na uzyskanie praktycznie wszystkich oocytów z izolowanych pęcherzyków, a oocyty morfologicznie normalne stanowią ponad 60%. Jej stosowanie pozwala ponadto precyzyjnie określić wielkość izolowanych pęcherzyków i stopień zaawansowania zmian atretycznych. Technika ta nie może być stosowana dla potrzeb programów hodowlanych, bowiem oocyty uzyskiwane od zwierząt rzeźnych na ogół nie stanowią materiału cennego pod względem genetycznym.

Obecnie istnieje możliwość użycia również żywych zwierząt jako dawców niedojrzałych oocytów, ponieważ opracowano nowy sposób ich przyżyciowego pobierania, tzw. metodą OPU (*Ovum Pick-Up*; szersze omówienie tego zagadnienia w odrębnym artykule, w bieżącym numerze).

### 3. Wpływ buhaja na efektywność produkcji zarodków

Wiadomo, że buhaj, a ściślej zróżnicowana podatność na kapacytację jego nasienia, wywiera zdecydowany wpływ na jakość produkowanych *in vitro* zarodków (3,16,32,34,36,38,62). Oznacza to konieczność selekcji buhajów,

czy nawet ejakulatów przeznaczanych do zapłodnienia pozaustrojowego. Z praktycznego punktu widzenia niezwykle istotne byłoby zatem dysponowanie metodą pozwalającą na użycie nasienia nie selekcjonowanych samców. Z przeprowadzonych przez nas badań wynika, że usunięcie osocza z nasienia, a zatem eliminacja czynników dekapacytujących, oddziałuje korzystnie na przebieg procesu kapacytacji *in vitro*, a w konsekwencji prowadzi do wzrostu odsetka dzielących się zarodków oraz zarodków osiągających stadium blastocysty (38). Jest to szczególnie istotne w przypadku buhajów o obniżonych zdolnościach zapładniających *in vitro*. Wykazaliśmy również, że plemniki otrzymane z ogona najądrza mogą być zamrażane, a następnie wykorzystane do zapłodnienia pozaustrojowego. Użycie takich plemników pozwala nie tylko na zwiększenie efektywności metody, lecz również na uzyskanie bardziej stabilnych wyników niż przy stosowaniu nasienia ejakulowanego. Tak też, odsetek blastocyst rozwijających się po zapłodnieniu przy użyciu nasienia najądrzowego oscylował między 21,0 i 36,5%, wartość średnia 30,6%, podczas gdy odpowiednie wartości dla nasienia ejakulowanego wynosiły od 2,6 do 38,0%, a średnia 18,0% (34). Podobne obserwacje poczynili ostatnio Rath i Niemann (57) badając przydatność do zapłodnienia pozaustrojowego mrożonych plemników pobieranych z ogona najądrza knura.

#### 4. Hodowla zarodków *in vitro*

Hodowla zarodków jest najbardziej newralgicznym etapem technologii IVP. Opracowano kilka systemów hodowli zarodków *in vitro* pozwalających na rozwój zygot do stadium blastocysty. Można je podzielić na dwa podstawowe rodzaje: a) takie, w których prowadzi się współhodowlę z komórkami somatycznymi, lub przynajmniej używana jest pożywka pobierana z hodowli komórek somatycznych; b) takie, w których nie stosuje się współhodowli, a zatem niezależne od obecności komórek somatycznych.

##### 4.1. Współhodowla z komórkami somatycznymi

Współhodowla z innymi typami komórek jest najczęściej stosowanym systemem hodowli zarodków bydłych. Dla wspomaganie rozwoju zarodków mogą być stosowane różne rodzaje komórek, tj. pęcherze trofoblastyczne (2,11,30); komórki wzgórka jajonośnego (6,18,24,49); endometrium macicznego (41,48); nabłonka jajowodu bydłego „BOE” (2,6,20,37); wątroby szczeni bawołowego „BRL” (8,28,39,66) i nerki afrykańskiej małpy zielonej „VERO” (25,39,55).

Najczęściej do współhodowli stosowane są komórki nabłonka jajowodu bydłego (BOEC). Komórki te uzyskuje się z jajowodów pobieranych poubojowo, materiał ten nie jest zatem poddawany testom bakteriologicznym. Użycie kriokonserwowanych komórek, zarówno BOEC jak i innych, umożliwia przeprowadzenie testów przed rozpoczęciem hodowli/współhodowli *in vitro*. Wykazano, że linie mrożonych komórek BOEC, BRL lub VERO mogą być

z powodzeniem użyte do współhodowli z zygotami bydłecymi. Zastosowanie tych komercyjnych linii komórkowych, które charakteryzuje łatwość pasażowania i zamrażania, pozwala na prowadzenie hodowli w kontrolowanych warunkach (8,25,28,39,55,66,70).

Najczęściej używanymi pożywkami do współhodowli zarodków z komórkami somatycznymi są TCM 199, SOF, Menezo B<sub>2</sub>. Porównując przydatności tych pożywek wykazano, że Menezo B<sub>2</sub> zdecydowanie przewyższa TCM 199 lub SOF (28,37). Próby wyjaśnienia różnic między pożywkami są tylko spekulacjami. Istnieje oczywiście szereg różnic w ich składzie. Pożywka SOF należy do najprostszych pod względem składu chemicznego i, jak się wydaje, jest niewystarczająca dla prawidłowej aktywności komórek somatycznych (37). Pożywki TCM 199 i Menezo B<sub>2</sub> oprócz soli mineralnych zawierają szereg aminokwasów i związków energetycznych niezbędnych dla prawidłowego rozwoju zarodków do stadium blastocysty (50).

Porównując rozwój zarodków bydłecych we współhodowli z różnymi rodzajami komórek somatycznych (39) stwierdzono niewielkie różnice w odsetkach blastocyst rozwijających się we współhodowli z komórkami BRL (39,8%), VERO (55,3%) czy BOEC (43,0%), natomiast znacznie różniła się jakość zarodków pochodzących z tych trzech systemów hodowli. Przejawiało się to w zdolności blastocyst do wylęgania (74,5; 58,0 i 34,7%), a także w zróżnicowanej liczbie komórek blastocysty ( $112,0 \pm 27,7$ ;  $76,8 \pm 20,0$  i  $94,0 \pm 23,6$  komórek w 8-dniowych blastocystach rozwijających się we współhodowli z BRL, VERO i BOEC).

Wcześniej stwierdzono, że 7-8-dniowe zarodki bydłce rozwijające się *in vivo* (u bydła poddanego superowulacji) w stadium ekspandującej blastocysty składają się z około 120-160 komórek (31,63). Podobną liczbę komórek mogą osiągnąć blastocysty rozwijające się we współhodowli z komórkami BRL. Natomiast, niezależnie od użytego systemu współhodowli, obserwowano znaczną asynchronię rozwoju, na co wskazuje, np. obecność zarodków w stadium od wczesnej do wyległej blastocysty w ósmym dniu od zapłodnienia. Oceniając przydatność użytych systemów hodowli na podstawie jakości blastocyst (tj. zdolności do wylęgania i osiągniętej liczby blastomerów) możemy wnioskować, że współhodowla z komórkami BRL stwarza korzystniejsze warunki rozwoju w porównaniu z innymi systemami, tj. VERO i BOEC (39). Ponadto, jak wynika z badań prowadzonych przez Voelkel i Hu (67), współhodowla zarodków z komórkami BRL ma jeszcze tę zaletę, że już 24-godzinna hodowla przed zamrażaniem zarodków wpływa korzystnie na ich przeżywanie po rozmrożeniu.

Spośród innych czynników oddziałujących na rozwój zarodków *in vitro* istotną rolę odgrywa ich zagęszczenie/liczba w tej samej kropli czy naczynku. Korzystniejsze warunki rozwoju stwarza inkubacja zarodków w większej, liczącej ponad 30 zarodków, grupie (65). Jest to efektem regulacji parakrynalnej (oddziaływanie jednego z czynników wzrostu: *Platelet-derived Growth Factor*). Tak zatem uzyskano 23,2; 20,2; 22,8 i 37,0% blastocyst, kiedy hodowano odpowiednio: 1, 2, 3-5 i > 30 oocytów w grupie. Ponadto, na zdolności rozwojowe zarodków hodowanych w małych grupach nie miał wpływu

rodzaj komórek (BRL, VERO, BOEC) użytych do współhodowli (39,52). Jednakże istnieje potrzeba opracowania metod uzyskiwania zarodków z zygot hodowanych w małych grupach, a nawet pojedynczo, np. gdy uzyskuje się oocyty od indywidualnych dawczyń, stosując OPU.

#### 4.2. Hodowla zarodków w pożywce syntetycznej

Oprócz współhodowli z komórkami somatycznymi hodowlę zarodków można prowadzić w pożywce pobieranej z hodowli komórek somatycznych (66) lub w pożywce o prostym składzie chemicznym, jak na przykład SOF, uzupełnionej surowicą (37,68,71). Hodowla zarodków w pożywce syntetycznej, o określonym składzie chemicznym, określana jest często jako „zdefiniowany” system hodowli, dla odróżnienia hodowli w pożywce bez surowicy i bez komórek somatycznych, od innych systemów. Definicja ta nie jest całkiem precyzyjna, ponieważ istnieje możliwość niepełnej identyfikacji wszystkich związków występujących w pożywce, np. niedawno okazało się, że kwas hydroksytylopiperazyno-etanolosiarkowy, tj. bufor HEPES stosowany jako związek buforujący pożywki, jest zanieczyszczony octanem, a 20 mM buforu może zawierać 0,1 – 0,3 mM octanu (1).

Opracowano szereg pożywek o prostym składzie chemicznym, uzupełnionych pewnymi substratami i białkami, np. CZB (12), CRI (58) czy CDM (59). Najistotniejsze osiągnięcie w tym zakresie to wykazanie korzystnego wpływu uzupełnienia pożywki aminokwasami, zarówno podstawowymi jak i uzupełniającymi (21,22,58). W badaniach płynu jajowodowego i macicznego wykazano, że koncentracja niektórych aminokwasów, a szczególnie glicyny, tauryny i alaniny jest znacznie wyższa niż w surowicy, a uzupełnienie pożywki alaniną i glicyną o koncentracji odpowiadającej stężeniu jajowodowemu powoduje wzrost odsetka rozwijających się zarodków (50). Negatywną konsekwencją dodatku aminokwasów do pożywki jest akumulacja jonów amonowych (21,22), które toksycznie oddziałują na zarodki. Tej interakcji jonów amonowych można przeciwdziałać dwoma sposobami, a mianowicie poprzez częściową wymianę pożywki, zanim ich stężenie osiągnie poziom toksyczny lub poprzez enzymatyczną eliminację z hodowli (21).

Wykazano również korzystny wpływ niektórych czynników wzrostu, tj. *Epidermal Growth Factor* (EGF), *Transforming Growth Factor-β* (TGF-β) oraz *Platelet Derived Growth Factor* (PDGF) na odsetek rozwijających się blastocyst (17,42,43,65). Ponadto, pożywki uzupełnia się często białkiem. Tradycyjnie stosowana jest albumina surowicy, ponieważ jest ona głównym białkiem stwierdzonym w płynie pobieranym z dróg rodnych. Jednakże nie ma bezwzględnej potrzeby stosowania białek w pożywce dla rozwoju zarodków (4,59). Brak również dowodów, że białko może stanowić źródło energii metabolicznej, w przypadku zarodków bydłych ATP powstaje poprzez metabolizm wodorowęglanów (40,67,68).

Rozwój zarodków przebiega podobnie w obu systemach hodowli (we współhodowli lub w pożywce uzupełnionej aminokwasami i czynnikami wzrostu), a całkowita liczba blastocyst w ósmym dniu od zapłodnienia oscyluje między

30 a 50%. Stało się zatem możliwe, niezależnie od użytego systemu hodowli, uzyskiwanie znacznej liczby zarodków. Jednakże ciągle jeszcze nie znamy odpowiedzi na pytania: Dlaczego tak wyprodukowane zarodki nie charakteryzują się podobną odpornością na stres jak zarodki rozwijające się *in vivo*? Czy jakieś inne kryteria niż wylęganie się blastocyst i osiągnięta liczba blastomerów, np. odporność na zamrażanie czy też synchronizacja tempa rozwoju, powinny być stosowane dla oceny jakości tych blastocyst? Przeżywalność *in vitro* wyprodukowanych zarodków okazała się, jak dotychczas, niższa niż pochodzących z rozwoju *in vivo* (27), szczególnie w przypadku, gdy zarodki poddawane są kriokonserwacji (56). Ponadto, w wielu doniesieniach wskazuje się na występowanie znacznych zaburzeń rozwojowych po transplantacji uzyskanych *in vitro* zarodków, a mianowicie wzrost śmiertelności zarodkowej, przedłużony okres trwania ciąży i znacznie większa masa ciała niż u cieląt uzyskanych w wyniku krycia naturalnego (7,14,27,69). Natomiast zygoty otrzymane z dojrzałych i zapłodnionych *in vitro* oocytów, rozwijające się w jajowodzie biorczyńi pośredniej — owcy, wykazują zdecydowanie wyższą przeżywalność i odporność na kriokonserwację niż zarodki pochodzące z kompleksowej metody *in vitro*. Odsetek zacieleń uzyskany w wyniku transplantacji tych zarodków był zbliżony do obserwowanego po transplantacji zarodków wyprodukowanych *in vivo* (19).

Mimo że zarodki wyprodukowane *in vitro* wykazują nieco obniżoną jakość i odporność w porównaniu z rozwijającymi się *in vivo*, produkcja zarodków metodami laboratoryjnymi stanowi dzisiaj realną alternatywę dla zarodków uzyskiwanych *in vivo*. Nieodzowna wydaje się jednak kontynuacja badań zmierzających do poprawy jakości tych zarodków, jak i efektywności poszczególnych etapów technologii IVP. Jest to istotne również dla innych technologii stosowanych w biotechnologii rozrodu jak klonowanie, uzyskiwanie zwierząt transgenicznych czy też kriokonserwacja zarodków.

## Literatura

1. Abas L., Guppy M., (1995), *Anal. Biochem.*, 229, 139-140.
2. Aoyagi Y., Fukui Y., Iwazumi Y., Urakawa M., Ono H., (1990), *Theriogenology*, 34, 749-759.
3. Barandi Z. S., Solti L., Cseh S., Varga Z. S., Machaty Z., Vajta G., (1993), *Anim. Reprod. Sci.*, 31, 13-19.
4. Bavister B. D., Rose-Hellecant T. A., Pinyopumminter T., (1992), *Theriogenology*, 37, 127-146.
5. Bedford J. M., Kim H. H., (1993), *J. Exp. Zool.*, 265, 321-328.
6. Behboodi E., Anderson G. B., BonDurant R. H., (1992), *Theriogenology*, 38, 1077-1084.
7. Behboodi E., Anderson G. B., Bondurant R. H., Cargill S. L., Kreuscher B. R., Medrano J. F., Murray J. D., (1995), *Theriogenology*, 44, 227-232.
8. Bevers M. M., (1995), *Protocol for the in vitro development of bovine blastocysts including IVM and IVF*, Dept. Herd Health and Reprod., University of Utrecht, 1-16.
9. Blondin P., Guibault L. A., Sirard M. A., (1995), *Theriogenology*, 43, 168.
10. Blondin P., Sirard M. A., (1995), *Mol. Reprod. Dev.*, 1, 54-62.
11. Camous S., Heyman Y., Meziou W., Menezo Y., (1984), *J. Reprod. Fertil.*, 72, 479-485.
12. Chatot C. L., Ziomek C. A., Bavister B. D., Lewis J. L., Torres I., (1989), *J. Reprod. Fertil.*, 86, 679-688.

13. de Loos F., Kastrop P., Vanmaurik P., Vanbeneden T. H., Kruij T. A. M., (1991), *Mol. Reprod. Develop.*, 28, 255-259.
14. Ectors F. J., Drion P. V., Delval A., Smith L. C., Sulon J., Zaaier D., Szenci O., Remy B., Beckers J. F., Ectors F., (1996), *Proc. 12<sup>th</sup> Sci. Meeting of AETE, Lyon*, 95-102.
15. Erickson B. H., (1966), *J. Anim. Sci.*, 25, 800-805.
16. Eyestone W. H., First N. L., (1989), *J. Reprod. Fertil.*, 85, 715-720.
17. Flood M. R., Gage T. L., Bunch T. D., (1993), *Theriogenology*, 39, 823-833.
18. Fucuda Y., Ichikawa M., Naito K., Toyoda Y., (1990), *Biol. Reprod.*, 42, 114-119.
19. Galli C., Duchi R., Lazzari G., (1995), *Proc. 11<sup>th</sup> Meeting of AETE, Hannover*, 174.
20. Gandolfi F., Moor R. M., (1987), *J. Reprod. Fertil.*, 81, 23-28.
21. Gardner D. K., (1994), *Cell. Biol. Int.*, 18, 1163-1179.
22. Gardner D. K., Lane M., Batt P., (1994), *Biol. Reprod.*, 50, 390-400.
23. Gordon I., Lu K. H., (1990), *Theriogenology*, 33, 77-87.
24. Goto K., Kajihara Y., Kosaka S., Koba M., Nakanishi Y., Ogawa K., (1988), *J. Reprod. Fertil.*, 83, 753-758.
25. Guyader-Joly C., Ponchon S., Durand M., Menck C., Heyman Y., (1996), *Proc. 12<sup>th</sup> Meeting of AETE, Lyon*, 136.
26. Hamano S., Kuwayama M., (1993), *Theriogenology*, 39, 703-712.
27. Hasler J. F., Henderson W. B., Hurtgen P. J., Jin Z. Q., Mccauley A. D., Mower S. A., Neely B., Shuey L. S., Stokes J. E., Trimmer S. A., (1995), *Theriogenology*, 43, 141-152.
28. Hawk H. W., Wall R. J., (1994), *Theriogenology*, 41, 1571-1583.
29. Hazeleger N. L., Stubbings R. B., (1992), *Theriogenology*, 37, 219.
30. Heyman Y., Menezo Y., Chesne P., Camous S., Garnier V., (1987), *Theriogenology*, 27, 59-68.
31. Heyman Y., Degrolard J., Adenot P., Chesne P., Flechon B., Renard J.P., Flechon J.E., (1995), *Reprod. Nutr. Dev.*, 35, 713-723.
32. Hillery F. L., Parrish J. J., First N. L., (1990), *Theriogenology*, 33, 249 abstr.
33. Kańska L., (1984), *Anim. Reprod. Sci.*, 7, 461-463.
34. Kańska L., (1996), *Biotechnologia*, 2 (33), 95-105.
35. Kańska L., Smorąg Z., (1984), *Anim. Reprod. Sci.*, 7, 451-460.
36. Kańska L., Ryńska B., (1994), *Proc. Eur. Conf. Embryo Techn. & Genet. Engin. in Cattle and Sheep, Kraków*, 215.
37. Kańska L., Ryńska B., Smorąg Z., (1995), *Theriogenology*, 43, 859-870.
38. Kańska L., Ryńska B., Smorąg Z., (1996), *Anim. Reprod. Sci.*, 44, 23-31.
39. Kańska L., Ryńska B., (1997), *Folia Histochemica et Cytobiologica*, 35, suppl. 2, 35 abstr.
40. Kim J. H., Niwa K., Lim J. M., Okuda K., (1993), *Biol. Reprod.*, 48, 1320-1325.
41. Kuzan F. B., Wright R. W. Jr., (1982), *Anim. Reprod. Sci.*, 5, 57-63.
42. Larson R. C., Ignatz G. G., Currie W. B., (1992a), *Development*, 115, 821-826.
43. Larson R. C., Ignatz G. G., Currie W. B., (1992b), *Mol. Reprod. Dev.*, 33, 432-435.
44. Leibfried-Rutledge M. L., Critser E. S., Parrish J. J., First N. L., (1989), *Theriogenology*, 31, 61-74.
45. Lohuis M. M., (1995), *Theriogenology*, 43, 51-60.
46. Lonergan P., (1992), Ph.D. Thesis, National University of Ireland, Dublin.
47. Lonergan P., Monaghan P., Rizis D., Boland M., Gordon I., (1994), *Mol. Reprod. Develop.*, 37, 48-53.
48. Marquant-Le Guienne B., Gerard M., Solari A., Thibault C., (1989), *Reprod. Nutr. Dev.*, 30, 259-266.
49. Mochizuki H., Fukui Y., Ono H., (1991), *Theriogenology*, 36, 973-986.
50. Moore K., Bondioli K. R., (1993), *Biol. Reprod.*, 48, 833-840.
51. Nancarrow C. D., Hill J. L., Connell P. J., (1992), *Proc. Aust. Soc. Reprod. Biol.*, 24, 71.
52. O'Doherty E. M., Wade M. G., Hill J. L., Boland M. P., (1996), *Arch. Tierz., Dummerstorf*, 39, Special Issue, 84.
53. Pavlok A., Lucas-Hahn A., Niemann H., (1992), *Mol. Reprod. Develop.*, 31, 63-67.
54. Pavlok A., Kopečný V., Lucas-Hahn A., Niemann H., (1993), *Mol. Reprod. Develop.*, 35, 233-243.



55. Pegoraro L. M. C., Thuard J. M., Delalleau N., Guerin B., Humblot P., Marquant-Le Guienne B., (1996), Proc. 12<sup>th</sup> Meeting AETE, Lyon, 182.
56. Pollard J. W., Leibo S. P., (1994), Theriogenology, 41, 101-106.
57. Rath D., Niemann H., (1997), Theriogenology, 47, 785-793.
58. Rozenkrans C. F. Jr, First N. L., (1994), J. Anim. Sci., 72, 434-437.
59. Seidel G. E. Jr, Glass T., Olson S. E., (1991), Biol. Reprod., 44, suppl. 1, 155.
60. Sirard M. A., Leibfried-Rutledge M. L., Parrish J. J., Ware C., First N. L., (1988), Biol. Reprod., 39, 546-552.
61. Sirard M. A., Blondin P., (1996), Anim. Reprod. Sci., 42, 417-426.
62. Shi D. S., Lu K. H., Gordon I., (1990), Theriogenology, 33, 324 abstr.
63. Skrzyszowska M., Smorag Z., (1989), Theriogenology, 32, 115-122.
64. Tan S. J., Lu K. H., (1990), Theriogenology, 33, 335.
65. Thibodeaux J. K., Myers M. W., Hansel W., (1995), Theriogenology, 43, 336.
66. Vansteenbrugge A., Vanlangendonck A., Scutenaire C., Massip A., Dessy F., (1994), Theriogenology, 42, 931-940.
67. Voelkel S. A., Hu Y. X., (1992), Theriogenology, 37, 687-697.
68. Walker S. K., Heard T. M., Seamark R. F., (1992), Theriogenology, 37, 111-126.
69. Wilson J. M., Williams J. D., Bondioli K. R., Loonley C. R., Westhusin M. E., McCalla D. F., (1995), Anim. Reprod. Sci., 38, 73-83.
70. Yang Y. B., Lu K. H., (1990), Theriogenology, 33, 355 abstr.
71. Younis A. I., Brackett B. G., Fayer-Hosken R. A., (1989), Gamete Res., 23, 189-202.

## Factors influencing quality and quantity of *in vitro* produced bovine embryos

### Summary

*In vitro* production of bovine embryos has become a routine, increasingly available technology. Presently this technique can yield approximately 40% of blastocysts in relation to the number of oocytes used for *in vitro* maturation and fertilization. However, available data indicate that *in vitro* produced bovine embryos are more susceptible to freezing and subject to a higher incidence of fetal loss following transfer. The comparison between *in vivo* (sheep oviducts) and *in vitro* (co-culture with somatic cells) embryo culture conditions revealed that *in vivo* conditions are superior in terms of quality of embryos. The factors influencing quantity and quality of *in vitro* produced embryos, i.e. the size of ovarian follicle for immature oocytes recovery, methods of oocytes recovery, morphology of immature oocytes, bull effect on IVF and possible ways to overcome these limitations as well as the effect of different embryo culture systems have been discussed.

### Key words:

cattle, oocytes IVM, IVF, bull effect, culture system, blastocysts hatching and cell number.

### Adres do korespondencji:

Lucyna Kańska, Zakład Fizjologii Rozrodu Zwierząt, Instytut Zootechniki, 32-083 Balice k. Krakowa; e-mail: lkanska@izoo.krakow.pl