

Zdolność oocytów klaczy do dojrzewania i zapłodnienia *in vitro*

WIESŁAWA MŁODAWSKA

Katedra Rozrodu i Anatomii Zwierząt, Uniwersytet Rolniczy w Krakowie, Al. Mickiewicza 24/28, 30-059 Kraków

Młodawska W.

In vitro maturation and fertilization capacity of mare oocytes

Summary

The aim of the review was to present current views on the factors influencing the *in vitro* maturation (IVM) and fertilization (IVF) of mare oocytes. The first two foals produced with the use of the so-called standard IVF (co-incubation of oocytes and spermatozoa in culture media) were born over 20 years ago. To date, it has been possible to obtain offspring in horses after the fertilization of *in vitro* matured oocytes by the intracytoplasmic sperm injection technique (ICSI) or by the surgical transfer of oocytes to the oviducts of inseminated mares (fertilization *in vivo*). Causes of the low efficiency of IVF in horses are complex and may be related to an incomplete maturation of oocytes, an inappropriate method of sperm capacitation *in vitro*, as well as the use of non-compliant media for the development of inseminated oocytes and/or early embryos. The paper describes the method of oocyte collection from mare ovaries and the most important factors influencing the number and quality of oocytes obtained. It discusses the relationship between the physiological status of ovarian follicles, cumulus oophorus morphology and the capacity of mare oocytes for *in vitro* maturation and fertilization. In addition, some aspects of nuclear and cytoplasmic maturation of equine oocytes are presented. The understanding of the *in vivo* maturation mechanisms of equine gametes and of the developmental requirements of embryos helps to improve culture conditions and the *in vitro* fertilization efficiency of equine oocytes.

Keywords: mares, oocytes, *in vitro* maturation, *in vitro* fertilization

Postęp badań w zakresie pozaustrojowej produkcji zarodków koni nie jest tak zaawansowany, jak u innych gatunków zwierząt gospodarskich. Pierwsze dwa źrebięta po zapłodnieniu *in vitro* (IVF) oocytów klaczy tzw. metodą standardową (wspólna inkubacja gamet w pożywce) urodziły się ponad 20 lat temu (5, 33). W doświadczeniach wykorzystano wówczas oocyty dojrzałe *in vivo*, pozyskane przyżyciowo z pęcherzyków przedowulacyjnych. Do chwili obecnej wyniku tego nie udało się powtórzyć. Otrzymanie potomstwa u koni po zapłodnieniu oocytów dojrzałych *in vitro* możliwe jest w jajowodach inseminowanych klaczy (zapłodnienie *in vivo*) lub *in vitro* metodą docytoplazmatycznej iniekcji plemnika (ICSI: intracytoplasmic sperm injection), a następnie transplantacji dzielących się zarodków do klaczy-bioreczyń (7, 14, 21, 22). Od końca lat 90. ubiegłego stulecia technika ICSI stosowana jest w nielicznych ośrodkach na świecie i w połączeniu z hodowlą *in vitro* poddanych zapłodnieniu oocytów prowadzi do uzyskania 5-89% dzielących się zarodków, z których 4-38% rozwija się do stadium moruli/blastocysty (3, 9, 13, 14, 21, 23). Odsetek zapłodnionych standardową metodą IVF oocytów klaczy waha się od 0% do 61% (9, 10, 24,

25, 34, 38) i nie jest możliwy do powtórzenia nawet w tym samym laboratorium (9, 10). Przyczyny niskiej skuteczności IVF u koni są złożone i mogą wynikać z niepełnej dojrzałości oocytów, niewłaściwych metod kapacytacji plemników ogiera *in vitro*, jak i stosowania pożywek niespełniających wymagań rozwojowych inseminowanych oocytów czy wczesnych zarodków.

Celem niniejszego opracowania jest przedstawienie aktualnych poglądów nt. czynników warunkujących kompetencję mejotyczną i rozwojową oocytów klaczy. Poznanie specyfiki dojrzewania gamet i wymagań rozwojowych zarodków koni jest kluczowe dla zwiększenia efektywności zapłodnienia *in vitro* oocytów zwierząt tego gatunku.

Specyfika cyklu rujowego klaczy

Klaczki należą do zwierząt sezonowo-poliestralnych z okresem największej płodności w czasie letniego przesilenia słonecznego. Cykl rujowy trwa u klaczy średnio 21 dni, sama ruja 5-7 dni, a owulacja następuje około 24-48 godzin przed końcem rui. Profil sekrecji LH w cyklu rujowym klaczy różni się znacznie od obserwowanego u innych gatunków samic zwierząt gospodarskich: wzrost sekrecji LH z przysadki rozpo-

czyna się na początku rui i osiąga najwyższy poziom po owulacji, tj. pod koniec rui (15). U innych gatunków zwierząt gospodarskich wylew LH poprzedza owulację i trwa 7-10 godzin u krów i około 30 godzin u świń (6). Oocyt klaczy dojrzewa więc w specyficznym mikrośrodku, wewnątrz pęcherzyka, który w momencie owulacji osiąga średnicę > 4 cm. Wykazano, iż faza cyklu jajnikowego i aplikacja klaczy CEG (crude equine gonadotrophin) może wywierać wpływ na kompetencję mejotyczną pozyskanych oocytów (18, 19).

Jajnik klaczy i metody pozyskiwania oocytów

Specyficzna budowa jajnika (położenie warstwy korowej wewnątrz gonady) i mała liczba wzrastających pęcherzyków antralnych w cyklu rujowym klaczy to główne czynniki ograniczające pulę oocytów dostępnych do badań, w tym nad zapłodnieniem *in vitro*. Średnia liczba pęcherzyków antralnych widocznych na powierzchni jajnika klaczy waha się od 6,5 do 8,4 (21, 27). Pęcherzyki obecne wewnątrz warstwy korowej, zwłaszcza te o mniejszej średnicy, uwidaczniają się dopiero po rozcięciu jajnika. Metodą poubojową, polegającą na rozcinaniu gonad co 4-8 mm stwierdzono, iż w jajniku klaczy znajduje się średnio 12,5 pęcherzyków antralnych, w tym 8,7 o średnicy 2-10 mm, 2,8 o średnicy 11-20 mm, 0,7 o średnicy 21-30 mm i 0,3 > 30 mm (28).

Hawley i wsp. (20) przeprowadzili porównawczą ocenę histomorfologiczną pęcherzyków antralnych klaczy i krowy. Stwierdzili, że w prawidłowych morfologicznie pęcherzykach klaczy wzgórek jajonośny otaczający oocyt był zwarty i silnie związany z podścielającą go warstwą ziarnistą. Wzgórek jajonośny krowy był obszerniejszy i luźniej przylegał do przyścielnej warstwy ziarnistej, a w jego obrębie i pomiędzy sąsiadującymi komórkami warstwy ziarnistej widoczne były drobne przestrzenie („okienka”) pozbawione komórek. U klaczy luźny i obszerny wzgórek jajonośny z „okienkami” obecny był głównie w pęcherzykach atretycznych (20). Ta specyficzna budowa jajnika i pęcherzyka jajnikowego wywiera wpływ na niski odzysk oocytów z jajników klaczy. Najmniej efektywną metodą pozyskiwania oocytów klaczy jest aspiracja płynu pęcherzykowego wraz z oocytem i otaczającym go wzgórkem jajonośnym. Tym sposobem z izolowanych jajników uzyskuje się średnio 1,75-3,0 oocytów/jajnik, tj. około 31-50% w porównaniu z liczbą wykorzystanych pęcherzyków (9, 17, 29, 30). Pobierając płyn z pęcherzyków jajnikowych klaczy *in vivo* pod kontrolą ultrasonografu, można odzyskać 22-84% oocytów z puli pęcherzyków o średnicy > 5 mm (8, 14, 17, 19, 21, 29). Aspiracja płynu pęcherzykowego przy pomocy igły i strzykawki zazwyczaj uszkadza wzgórek jajonośny, uzyskane oocyty są więc częściowo lub całkowicie pozbawione komórek pęcherzykowych. Obecnie do pozyskiwania

oocytów z izolowanych jajników klaczy najczęściej stosuje się metodę polegającą na pobieraniu warstwy ziarnistej z rozciętych pęcherzyków antralnych za pomocą łyżeczek chirurgicznych. Nie uszkadzając wzgórka jajonośnego można w ten sposób odzyskać średnio 2,3-4,9 oocytów z jajnika, tj. 55-71% w odniesieniu do liczby pęcherzyków (1, 13, 14, 23, 28). Poubojowo z jajnika krowy metodą aspiracji płynu pęcherzykowego uzyskuje się średnio 7,05 oocytów (26).

Morfologia wzgórka jajonośnego klaczy a kompetencja mejotyczna oocytów

Kryteria klasyfikacji oocytów do hodowli najczęściej opierają się na ocenie liczby i spoistości komórek wzgórka jajonośnego otaczających oocyt oraz na ocenie wyglądu ooplazmy. U bydła do hodowli przeznaczane są oocyty z jasną, jednorodną ooplazmą, otoczone zwartym, wielowarstwowym wzgórkem jajonośnym (26). U klaczy do badań *in vitro* najczęściej wykorzystywane są dwie klasy morfologiczne oocytów: te posiadające zwarty, wielowarstwowo wzgórek jajonośny i ciemną, jednorodną ooplazmę (CpCOCs: compact cumulus oocyte complexes) oraz te otoczone rozproszonym wzgórkem jajonośnym (ExCOCs: expanded cumulus oocyte complexes), charakteryzujące się granularną i niejednorodną ooplazmą. W prawidłowym morfologicznie pęcherzyku jajnikowym proces rozproszenia (mucyfikacji) komórek wzgórka jajonośnego i wznowienia mejozy przez oocyt indukowany jest wylewem LH i zachodzi bezpośrednio przed owulacją (11). Proces ten obserwowany jest również w atretycznych pęcherzykach antralnych. W wyniku atrezji pęcherzyk traci zdolność do utrzymania oocytu w stadium diplotenu profazy I podziału mejotycznego, dochodzi do wznowienia mejozy oraz utraty połączeń szczelinowych pomiędzy komórkami wzgórka jajonośnego i ich rozproszenia (20, 22). Oocyty klaczy otoczone rozproszonym wzgórkem jajonośnym pochodzą z pęcherzyków atretycznych i większość z nich już w momencie pozyskania znajduje się w stadium diakinezy profazy I podziału mejotycznego, a niektóre w stadium metafazy I lub II (1, 2, 28, 37). Badania dowodzą, iż ExCOCs w krótszym czasie uzyskują stadium metafazy II *in vitro* niż CpCOCs, odpowiednio, po około 24 i 32-36 godzinach hodowli (1, 22, 23, 28, 37). Według niektórych autorów, CpCOCs wykazują niższą zdolność do dojrzewania (1, 14, 22, 23) i więcej ich degeneruje w trakcie hodowli *in vitro* niż ExCOCs (1, 22, 23). Inni autorzy nie stwierdzili istotnego wpływu spoistości komórek wzgórka jajonośnego na kompetencję mejotyczną (9, 17, 28) ani na odsetek oocytów zdegenerowanych *in vitro* (14).

Wielkość pęcherzyka jajnikowego i zdolność oocytu do dojrzewania mejotycznego

Zdolność do dojrzewania mejotycznego, zapłodnienia i rozwoju zarodkowego oocytu jest pozytywnie

skorelowana z wielkością pęcherzyka, niekoniecznie jednak z maksymalną średnicą oocyty (39). U bydła wraz z wielkością pęcherzyka wzrasta równocześnie średnica oocyty oraz jego kompetencja mejotyczna i rozwojowa (4). U koni oocyty pobrane z małych (≤ 10 mm) pęcherzyków antralnych charakteryzują się obniżoną zdolnością dojrzewania *in vitro* w porównaniu z oocytami pochodzącymi z pęcherzyków o większej średnicy (18, 19). Równocześnie, wraz z progresją jądra oocyty ze stadium diplotenu (tzw. pęcherzyka zarodkowego) do stadium metafazy II, stwierdzono zmniejszenie się średnicy ooplazmy ze 123 do 115 μm (19). Oocyty rebusów uzyskują maksymalną średnicę już w małych pęcherzykach antralnych, a nabywanie kompetencji mejotycznej związane jest kondensacją chromatyny wokół jąderka i wzrostem pęcherzyka (35). Można zatem założyć, iż podobnie jak u rebusów, oocyty klaczy najpierw kończą proces wzrostu (w małych pęcherzykach antralnych), po czym w rosnącym pęcherzyku podejmują dojrzewanie cytoplazmatyczne i stopniowo nabywają kompetencję mejotyczną i rozwojową, a wznowieniu mejozy towarzyszy redukcja objętości ooplazmy. Obniżona zdolność oocytów pobranych z małych pęcherzyków antralnych do uzyskania stadium metafazy II *in vitro* sugeruje zatem, iż prawdopodobnie nie są one jeszcze „gotowe” do podjęcia procesu dojrzewania jądrocytoplazmatycznego.

Dojrzewanie *in vitro* oocytów klaczy

Podstawowym warunkiem zdolności oocyty do zapłodnienia, wczesnych podziałów, następnie prawidłowego rozwoju zarodkowego oraz płodowego jest zakończenie procesów prowadzących do osiągnięcia pełnej dojrzałości jądrowej i cytoplazmatycznej (36). *In vitro* oocyty najczęściej podejmują dojrzewanie jądrowe, uzyskując stadium metafazy II, natomiast pozostałe procesy warunkujące nabycie kompetencji rozwojowej przebiegają w sposób niepełny, nieprawidłowy lub nie są inicjowane. Badania dowodzą, iż oocyty klaczy, które w warunkach *in vitro* uzyskały stadium MII, różnią się od swych fizjologicznie dojrzałych odpowiedników. Są od nich większe, posiadają szersze i dłuższe wrzeciona podziałowe (metafazy I i II), i wykazują niższą aktywność kinazy histonowej H1 (18, 19). W oocytach dojrzałych *in vitro* stwierdzono istotnie niższy poziom acetylacji reszt lizyny (w pozycji 16) histonu H4 (H4K16) niż w oocytach niedojrzałych i dojrzałych *in vivo* (12). Obserwacje te sugerują, że warunki *in vitro* prowadzą do częściowej deacetylacji H4K16, co, zdaniem autorów, może zaburzyć proces segregacji chromosomów, a w konsekwencji obniżyć potencjalną zdolność rozwojową oocytów (12).

Molekularne aspekty dojrzewania cytoplazmatycznego oocytów klaczy są słabo poznane. Zjawiska te obejmują reorganizację organelli komórkowych, syntezę protein niezbędnych do dojrzewania, zapłodnienia

i rozwoju zarodkowego oraz modyfikacje postranastajne *de novo* syntetyzowanych białek (36). U bydła, świń i owiec wznowienie mejozy poprzedza synteza białek i aktywacja MPF (maturation promoting factor) (31). U koni, w zależności od morfologii wzgórka jajonośnego ExCOCs i CpCOCs syntetyzują białka niezbędne do dojrzewania mejotycznego, odpowiednio, w ciągu pierwszych 8 i 12 godzin hodowli *in vitro* (1). Obecność MPF i MAPK (kinazy białkowe aktywowane mioginem) wykazano zarówno w niedojrzałych, jak i dojrzałych oocytach klaczy (2, 16). Stopień fosforylacji MAPK zależny były od spoistości komórek wzgórka jajonośnego, czasu trwania hodowli i dojrzałości jądrowej oocyty (2, 16). Podobne zależności odnotowano odnośnie do rozmieszczenia i aktywności mitochondriów (3, 37) oraz kropli lipidowych (3) w oocytach klaczy. Wykazano, że obecność roskovityny (inhibitor wznowienia mejozy) w pożywce hodowanej przejściowo utrzymuje oocyty w stadium diplotenu, co prawdopodobnie inicjuje molekularny mechanizm dojrzewania cytoplazmatycznego i w konsekwencji zwiększa kompetencję rozwojową, ale tylko CpCOCs (13). Przytoczone badania dowodzą, iż ExCOCs i CpCOCs klaczy różnią się nie tylko pod względem morfologicznym, ale również ultrastrukturalnym i molekularnym. Prawdopodobnie ExCOCs podejmują syntezę białek koniecznych do wznowienia mejozy jeszcze przed pozyskaniem i w efekcie w krótszym czasie hodowli dojrzewają do stadium metafazy II. Pomimo tych różnic nie stwierdzono istotnego wpływu morfologii wzgórka jajonośnego w momencie pozyskania na odsetek morul i blastocyst uzyskanych w wyniku zapłodnienia oocytów klaczy metodą ICSI (14, 22, 23).

Do hodowli oocytów klaczy najczęściej wykorzystuje się pożywki TCM 199 lub DMEM/F12 wzbogacone dodatkami różnych stężeń surowic, hormonów i/lub czynników wzrostu, płynu pęcherzykowego czy komórek pęcherzykowych, a do kapacytacji *in vitro* plemników ogiera różne sposoby ich selekcji i aktywacji reakcji akrosomowej (10, 14, 17, 21, 22, 24, 25, 32, 34). Żadna z proponowanych procedur nie zwiększyła w sposób powtarzalny efektywności zapłodnienia dojrzałych *in vitro* oocytów standardową metodą IVF. Oocyty dojrzałe w warunkach pozaustrojowych wykazują niski potencjał rozwojowy i po zapłodnieniu *in vivo* w jajowodach inseminowanych klaczy tylko 9-18% spośród nich jest zdolnych do implantacji i dalszego rozwoju zarodkowego (21). Obserwacje te dowodzą, iż w warunkach *in vitro* proces dojrzewania oocytów klaczy przebiega w sposób nieprawidłowy bądź niepełny. Dogłębne poznanie molekularnych i epigenetycznych mechanizmów kierujących procesem dojrzewania oocytów *in vivo* pozwoliłoby na optymalizację warunków hodowli i uzyskanie wysokiej jakości oocytów, wykazujących pełną kompetencję mejotyczną i rozwojową.

Piśmiennictwo

1. Alm H., Hinrichs K.: Effect of cycloheximide on nuclear maturation of horse oocytes and its relation to initial cumulus morphology. *J. Reprod. Fert.* 1996, 107, 215-220.
2. Alm H., Torner H., Tomek W., Młodawska W., Okólski A., Kanitz W.: MAP kinase and AKT activities in equine oocytes depending on cumulus morphology during maturation in vitro. Havemeyer Foundation, Monograph Series 13, R&W Publications (Newmarket) Ltd, 2004, 17-19.
3. Ambruosi B., Lacalandra G. M., Iorga A. I., De Santis T., Mugnier S., Matarrese R., Goudet G., Dell'aquila M. E.: Cytoplasmic lipid droplets and mitochondrial distribution in equine oocytes: Implications on oocyte maturation, fertilization and developmental competence after ICSI. *Theriogenology* 2009, 71, 1093-1104.
4. Arlotto T., Schwartz J. L., First N. L., Leibfried-Rutledge M. L.: Aspects of follicle and oocyte stage that affect in vitro maturation and development of bovine oocytes. *Theriogenology* 1996, 45, 943-956.
5. Bézard J.: Zapłodnienie in vitro u koni. *Mat. Międzynarod. Konf. pt. Biotechniki w Rozrodzie Koni. Łañcut* 1992, s. 25-26.
6. Bielański A., Tischner M.: *Biochnologia rozrodu zwierząt udomowionych*. Wydawnictwo i drukarnia „Drukrol” s. c., Kraków 1997.
7. Cochran R., Meintjes M., Reggo B., Hyland D., Carter J., Pinto C., Paccamonti D., Godke R. A.: Live foals produced from sperm-injected oocytes derived from pregnant mare. *J. Vet. Sci.* 1998, 18, 736-740.
8. Cook N. L., Squires E. L., Ray B. S., Jasko D. J.: Transvaginal ultrasound-guided follicular aspiration of equine oocytes. *Equine Vet. J. Suppl.* 1993, 15, 71-74.
9. Dell'Aquila M. E., Cho Y. S., Minoia P., Traina V., Fusco S., Lacalandra G. M., Maritato F.: Intracytoplasmic sperm injection (ICSI) versus conventional IVF on abattoir-derived and in vitro-matured equine oocytes. *Theriogenology* 1997, 47, 1139-1156.
10. Dell'Aquila M. E., Cho Y. S., Minoia P., Traina V., Lacalandra G. M., Maritato F.: Effects of follicular fluid supplementation of in-vitro maturation medium on the fertilization and development of equine oocytes after in-vitro fertilization or intracytoplasmic sperm injection. *Human Reprod.* 1997, 12, 2766-2772.
11. Eppig J. J.: Oocyte control of ovarian follicular development and function in mammals. *Reproduction* 2001, 122, 829-838.
12. Franciosi F., Lodde V., Goudet G., Duchamp G., Deleuze S., Douet C., Tessaro I., Luciano A. M.: Changes in histone H4 acetylation during in vivo versus in vitro maturation of equine oocytes. *Mol. Hum. Reprod.* 2012, 18, 243-252.
13. Franz L. C., Choi Y. H., Squires E. L., Seidel G. E. Jr., Hinrichs K.: Effects of roscovitine on maintenance of the germinal vesicle in horse oocytes, subsequent nuclear maturation, and cleavage rates after intracytoplasmic sperm injection. *Reproduction* 2003, 125, 693-700.
14. Galli C., Colleoni S., Duchi R., Lagutina J., Lazzari G.: Developmental competence of equine oocytes and embryos obtained by in vitro procedures ranging from in vitro maturation and ICSI to embryo culture, cryopreservation and somatic cell nuclear transfer. *Anim. Reprod. Sci.* 2007, 98, 39-55.
15. Ginther O. J.: *Reproductive Biology of the Mare: Basic and Applied Aspects*. Equiservices, Cross Plains., Wisconsin, USA 1992.
16. Goudet G., Belin F., Bézard J., Gérard N.: Maturation-promoting factor (MPF) and mitogen activated protein kinase (MAPK) expression in relation to oocyte competence for in-vitro maturation in the mare. *Mol. Hum. Reprod.* 1998, 4, 563-570.
17. Goudet G., Belin F., Młodawska W., Bézard J.: Influence of epidermal growth factor on in vitro maturation of equine oocytes. *J. Reprod. Fert. Suppl.* 2000, 56, 483-492.
18. Goudet G., Bézard J., Belin F., Duchamp G., Palmer E., Gerard N.: Oocyte competence for in vitro maturation is associated with Histone H1 Kinase activity and is influenced by estrous cycle in the mare. *Biol. Reprod.* 1998, 69, 456-462.
19. Goudet G., Bézard J., Duchamp G., Gérard N., Palmer E.: Equine oocyte competence for nuclear and cytoplasmic in vitro maturation: effect of follicle size and hormonal environment. *Biol. Reprod.* 1997, 57, 232-245.
20. Hawley L. R., Enders A. C., Hinrichs K.: Comparison of equine and bovine oocyte-cumulus morphology within the ovarian follicle. *Biol. Reprod.* 1995, Mono 1, 243-252.
21. Hinrichs K.: Assisted reproduction techniques in the horses. *Reprod. Fert. Dev.* 2012, 25, 80-93.
22. Hinrichs K.: The equine oocyte: factors affecting meiotic and developmental competence. *Mol. Reprod. Dev.* 2010, 77, 651-661.
23. Hinrichs K., Choi Y. H., Love L. B., Varner D. D., Love C. C., Walckenaer B. E.: Chromatin configuration within the germinal vesicle of horse oocytes: changes post mortem and relationship to meiotic and developmental competence. *Biol. Reprod.* 2005, 72, 1142-1150.
24. Hinrichs K., Love C. C., Brinsko S. P., Choi Y. H., Varner D. D.: In vitro fertilization of in vitro-matured equine oocytes: effect of maturation medium, duration of maturation, and sperm calcium ionophore treatment, and comparison with rates of fertilization in vivo after oviductal transfer. *Biol. Reprod.* 2002, 67, 265-262.
25. McPartlin L. A., Suarez S. S., Czaya C. A., Hinrichs K., Bedford-Guaus S. J.: Hyperactivation of stallion sperm is required for successful in vitro fertilization of equine oocytes. *Biol. Reprod.* 2009, 81, 199-206.
26. Mermillod P., Wils C., Massip A., Dessy F.: Collection of oocytes and production of blastocysts in vitro from individual, slaughtered cows. *J. Reprod. Fert.* 1992, 96, 717-723.
27. Młodawska W., Kaniowska D., Tischner M.: Morphology of ovaries and in vitro maturation of filly oocyte-cumulus complexes. Havemeyer Foundation Monograph Series 13, R&W Publications (Newmarket) Ltd, 2004, 13-16.
28. Młodawska W., Okólski A.: Morphological characterization and meiotic competence of oocytes collected from filly ovaries. *Theriogenology* 2009, 71, 1046-1053.
29. Młodawska W., Palmer E., Duchamp G., Okólski A., Bézard J.: Zona pellucida-sperm binding assay for equine oocytes. *J. Reprod. Fert. Suppl.* 2000, 56, 423-429.
30. Młodawska W., Slonina D., Okólski A.: Metody pozyskiwania oocytów z pęcherzyków jajnikowych kłaczy oraz ich hodowla w warunkach in vitro. *Acta Agr. Silv. Zootech.* 1995, 33, 65-73.
31. Motlik J., Kubelka M.: Cell-cycle aspects of growth and maturation of mammalian oocytes. *Mol. Reprod. Dev.* 1990, 27, 366-375.
32. Okólski A., Slonina D., Banasińska K.: In-vitro maturation of equine oocytes in co-culture with granulosa and theca interna cells. *Equine Vet. J. Suppl.* 1993, 15, 84-86.
33. Palmer E., Bézard J., Magistrini M., Duchamp G.: In vitro fertilization in the horse. A retrospective study. *J. Reprod. Fert. Suppl.* 1991, 44, 375-384.
34. Roasa L. M., Choi Y. H., Love C. C., Romo S., Varner D. D., Hinrichs K.: Ejaculate and type of freezing extender affect rates of fertilization of horse oocytes in vitro. *Theriogenology* 2007, 68, 560-566.
35. Schramm R. D., Bavister B. D.: A macaque model for studying mechanisms controlling oocyte development and maturation in human and non-human primates. *Hum. Reprod.* 1999, 15, 2544-2555.
36. Sirard M. A., Richard F., Blondin P., Robert C.: Contribution of the oocyte to embryo quality. *Theriogenology* 2006, 65, 126-136.
37. Torner H., Alm H., Kanitz W., Goellnitz K., Becker F., Poehland R., Bruessow K. P., Tuchscherer A.: Effect of initial cumulus morphology on meiotic dynamic and status of mitochondria in horse oocytes during IVM. *Reprod. Domest. Anim.* 2007, 42, 176-183.
38. Torner H., Alm H., Młodawska W., Warnke C., Blottner S., Okólski A.: Determination of development in horse zygotes and spermatozoa during fertilization in vitro. *Theriogenology* 2002, 58, 693-696.
39. Trounson A., Anderiesz C., Jones G.: Maturation of human oocytes in vitro and their developmental competence. *Reproduction* 2001, 121, 51-75.

Adres autora: dr Wiesława Młodawska, Al. Mickiewicza 24/28, 30-059 Kraków; e-mail: rzmlodaw@cyf-kr.edu.pl