

Praca oryginalna

Original paper

# Rozwój zarodków bydła po zapłodnieniu *in vitro* oocytów uzyskanych z pęcherzyków jajnikowych metodą OPU oraz rezultaty ich zamrażania i transferu

KRZYSZTOF PAPIS\*, JAROSŁAW WOJDAN\*\*, ELŻBIETA WENTA-MUCHALSKA\*,  
ZBIGNIEW KOŁODZIEJSKI\*\*\*, WITOLD GAWRON\*\*

\*Zakład Embriologii Doświadczalnej i \*\*Zakład Genetyki i Hodowli Bydła Instytutu Genetyki i Hodowli Zwierząt PAN  
w Jastrzębcu, ul. Postępu 1, 05-552 Wólka Kosowska

Papis K., Wojdan J., Wenta-Muchalska E., Kołodziejski Z., Gawron W.  
**Development in-vitro of bovine embryos obtained following OPU/IVP  
and the results of their freezing and transfer**

## Summary

In order to evaluate the efficiency of OPU/IVP production of bovine embryos and to examine their quality after freezing, oocytes were obtained twice a week from 5 donor heifers. 232 oocytes were collected following 13 OPU sessions (an average of 3.6 per oocyte per donor per session) and 28 embryos (12%) at the blastocyst stage were produced in-vitro. Twenty four suitable embryos were frozen and, after thawing, were transferred to 12 recipients. Four recipients (33%) became pregnant and delivered 4 calves. This was the first case in Poland where calves were obtained after the OPU/IVP/embryo freezing procedure.

**Keywords:** bovine, ovum pick-up, in-vitro embryo production, frozen embryo transfer

Wykorzystanie pełnego potencjału rozrodczego samicy nie jest możliwe bez zastosowania biotechnik rozrodu. W przypadku bydła w grę wchodziło do niedawna głównie niechirurgiczne wypłukiwanie zarodków, poprzedzone hormonalną indukcją mnogiej owulacji. Obiecującą alternatywą okazała się pozaustrojowa produkcja zarodków tego gatunku zwierząt (IVP, *in vitro* production) oparta na przyżyciowym uzyskiwaniu oocytów od samic cennych genetycznie.

W końcu lat 80-tych podejmowano pierwsze próby przyżyciowego pozyskiwania oocytów bydła stosując przezskórną punkcję pęcherzyków jajnikowych pod kontrolą ultrasonografu (4) lub przezpochwową aspirację przy użyciu laparoskopu (26). W toku kolejnych doświadczeń okazało się jednak, że metodą względnie prostą i nietraumatyzującą, a jednocześnie przynoszącą najlepsze efekty, jest przezpochwowa aspiracja oocytów z pęcherzyków jajnikowych pod kontrolą ultrasonograficzną (8, 12, 15, 16, 21). Do tej właśnie metody odnosi się zasadniczo używany dziś powszechnie termin OPU (ovum pick-up) (10, 12, 15, 21, 24). Początkowo, pomimo interesujących wyników i optymistycznych kalkulacji sugerujących możliwość uzyskiwania rocznie do 100 zarodków od jednej dawczyni oocytów (15) oraz pomimo równoczesnego dynamicznego rozwoju metod produkcji zarodków bydła *in vitro* z oocytów uzyskiwanych poubojowo, wydaj-

ność metody określana liczbą zarodków uzyskiwanych przeciętnie od dawczyni nie była zbyt wysoka, oscylując w granicach od 0,41 do 1,3 zarodka na sesję (2, 3, 9, 12, 15, 24). Stwierdzono natomiast, że pobieranie tą metodą komórek dwa razy w tygodniu nie przynosi szkody dawczyniom, nawet jeśli kontynuowane jest przez 10-12 tygodni (15). Ponadto odsetek zarodków uzyskiwanych średnio w przeliczeniu na 1 sesję OPU wzrasta wraz z wprawą operatorów i personelu laboratoryjnego – od 1,3 w 1997 r. do 2,4 w 2000 r. (9).

W Polsce, poważniejsze zainteresowanie metodą OPU datuje się od międzynarodowej konferencji zorganizowanej w Krakowie w 1994 r. (15). Opis metody i pierwsze rezultaty pojawiły się w krajowym piśmiennictwie w drugiej połowie lat 90-tych (5, 10, 19, 24). W IGHZ PAN w Jastrzębcu uzyskiwano w badaniach własnych zarodki OPU/IVP począwszy od 1997 r., a następnie w 1998 r. (6). W 1999 r. opisano urodzenie pierwszych w Polsce cieląt uzyskanych w wyniku transferu zarodków otrzymanych metodą OPU/IVP (25).

Celem przeprowadzonych badań było określenie warunków i wydajności produkcji zarodków bydła hodowanych *in vitro* z oocytów pozyskiwanych przyżyciowo metodą OPU, z uwzględnieniem możliwości użycia do transferu zarodków poddanych kriokonserwacji.



## Material i metody

Dawczyniami oocytów było 5 jałówek czarno-białych (hf) w wieku 17 miesięcy. Oocyty pobierano dwa razy w tygodniu, przez 6 i pół tygodnia (13 sesji). Przed zabiegiem, jałowki poddawano ogólnej sedacji (Domosedan, Pfizer lub Rometar, Spofa, Praha) oraz znieczuleniu nadoponowemu (2% polokaina, Biowet, Drwalew). Oocyty, wraz z otaczającymi je warstwami komórek wzgórka jajonośnego odzyskiwano z płynu pęcherzykowego zasysanego igłą 18G wprowadzaną do pęcherzyków jajnikowych przez sklepienie pochwy pod kontrolą ultrasonografu typ Scanner 200 Vet (Pie Medical, Holandia). Płyn pęcherzykowy zbierano do probówek zawierających ok. 2 ml pożywki TCM 199 (Gibco) buforowanej Hepesem (Sigma), uzupełnionej 5% cielejcej surowicy płodowej (FCS, Gibco) i 20 iu/ml heparyny (Sigma).

Stosowano dwuetapową ocenę pozyskanych oocytów. Ocena wstępna, dokonywana bezpośrednio po pozyskaniu, polegała głównie na ocenie ilości i stanu komórek ziarnistych wzgórka jajonośnego, otaczających komórkę jajową. Oocyty, całkowicie lub w znacznym stopniu pozbawione komórek pęcherzykowych i komórek wieńca promienistego oceniano ponadto pod kątem wyglądu cytoplazmy. Oceniano również stan osłonki przejrzystej. Z dalszej hodowli wykluczano na tym etapie jedynie (nieliczne) oocyty z uszkodzoną osłonką przejrzystą.

Oocyty uzyskiwane od poszczególnych dawczyń umieszczane były wraz z otaczającymi je warstwami komórek ziarnistych pęcherzyka w osobnych kroplach pożywki TCM (Gibco) uzupełnionej dodatkiem 0,2 mM pirogronianu sodowego (Sigma), 0,4 mM L-glutaminy (Sigma), 20 iu/ml hCG i PMSG (PG 600, Intervet) i 10% FCS, pokrytych warstwą oleju parafinowego (Merck) (1). Komórki poddawane były dojrzewaniu w temperaturze 38,5°C w atmosferze 4% dwutlenku węgla w powietrzu przez okres 22÷26 godz. Następnie oocyty oczyszczano częściowo z komórek pęcherzykowych i poddawano drugiemu etapowi oceny przeprowadzanej pod kątem wyglądu cytoplazmy i obecności pierwszego ciała kierunkowego (jeśli było wykrywalne). Komórki jajowe uznawano za prawidłowe, jeśli cechowały się względnie jednorodną cytoplazmą, zaznaczoną przestrzenią okołojółtkową i jeśli (w przypadku oocytów nagich) widoczne było pierwsze ciało kierunkowe. Rozproszone komórki pęcherzykowe uzyskane po częściowym oczyszczeniu oocytów, pozostawiano w kroplach pożywki w celu uzyskania warstwy odżywczej wykorzystywanej do późniejszej współhodowli zarodków. Inseminację oocytów przeprowadzano w zmodyfikowanej pożywece Tyroda (TALP) zamrożonym nasieniem tego samego buhaja, poddanym wirowaniu w gradiencie percolu, a następnie rozcieńczonym do koncentracji ok. 2 x 10<sup>6</sup>/ml żywych plemników (1). W 16 ÷ 18 godz. później potencjalne zygoty oczyszczano z resztek komórek pęcherzykowych oraz plemników i umieszczano w kroplach zmodyfikowanej pożywki CR1aa (23) uzupełnionej dodatkiem 3 mg/ml albuminy surowicy bydlęcej (BSA, Sigma) i 0,25 mg/ml kwasu linoleinowego (Sigma) (CR1aaLA, 20, 28). Po trzech dniach hodowli zarodki przenoszono do kropli pożywki CR1aaLA wzbogaconej 5% FCS, zaś po kolejnych 2 dniach, do kropli pożywki zawierającej warstwę odżywczą komó-

rek ziarnistych i wzbogaconej dodatkowo glukozą (1mg/ml). Hodowlę zygot i zarodków prowadzono w atmosferze 5% dwutlenku węgla, 5% tlenu i 90% azotu przy maksymalnej wilgotności powietrza.

Zarodki rozwinięte prawidłowo do stadium blastocysty lub ekspandującej blastocysty poddawano kriokonserwacji w miarę ich pojawiania się pomiędzy szóstym a dziewiątym dniem hodowli. Zamrażanie przeprowadzano metodą skróconą (dwustopniową). Jako środek kriochronny stosowano 1,8 molowy glikol etylenowy rozcieńczony w zmodyfikowanej pożywece Dulbecco (PB1, 30) zawierającej dodatkowo 20% FCS. Zarodki przed zamrożeniem umieszczano w roztworze glikolu etylenowego na okres 10÷15 min. W tym czasie zarodki przenoszono do słomek inseminacyjnych o pojemności 0,25 ml (Cryo Bio System, IVM Technologies). Końcówki słomek zgrzewano, a słomki umieszczano w programowanej zamrażarce firmy Planer nastawionej na -7°C. Po pięciominutowej ekwilibracji pobudzano krystalizację roztworu (posiewanie), przytrzymując słomki pincetą schłodzoną w ciekłym azocie. Po kolejnych 5 min. rozpoczynano schładzanie prowadzone z szybkością 0,3°/min. do temperatury -35°C. Następnie słomki przenoszono bezpośrednio do ciekłego azotu, w którym były przechowywane przez okres kilku miesięcy. Zarodki rozmrażano na kilka – kilkanaście godz. przed planowanym transferem. Rozmrażanie przeprowadzano w powietrzu (30 sekund), a następnie w wodzie o temperaturze +30°C. Po rozmrożeniu i wypłukaniu środka osłaniającego zarodki poddawano ocenie i umieszczano w kroplach pożywki hodowlanej (CR1aaLA + 5% FCS + glukoza + warstwa komórek). Bezpośrednio przed transferem zarodki zakwalifikowane do transferu umieszczano w słomkach inseminacyjnych (na ogół po 2 zarodki) i przewożono na miejsce transferu w przenośnej cieplarni, w temperaturze 38°C. Jako biorecipient zarodków posłużyło 12 jałówek w wieku 16-18 miesięcy, których cykl rujowy synchronizowano przy pomocy jednorazowej lub dwukrotnej iniekcji analogu prostaglandyny F2α (Bioestrovect, Biowet, Gorzów Wielkopolski).

## Wyniki i omówienie

Wyniki pozyskiwania oocytów przedstawiono w tab. 1 i 2. Przeprowadzono ogółem 13 sesji pozyskiwania komórek, uzyskując podczas 65 zabiegów łącznie 232 oocyty z 482 nakłutych pęcherzyków (odzysk 48,1%). Średnio od jednej jałowki uzyskano więc 46,4 oocyta (w zakresie od 25 do 77 oocytów).

Spośród ogólnej liczby 28 blastocyst uzyskanych w rezultacie hodowli *in vitro*, 24 spełniały kryteria morfologiczne i rozwojowe w stopniu pozwalającym na zakwalifikowanie ich do kriokonserwacji. Oznacza to m.in., że osiągnęły one wymagane stadium najpóźniej w ósmym dniu hodowli i zawierały dużą liczbę komórek, w tym widoczne zgrupowanie komórek węzła zarodkowego. Posiadały również nieuszkodzoną osłonkę przejrzystą. Po rozmrożeniu, w wyniku przeprowadzonej dwukrotnie oceny morfologicznej (natychmiast po rozmrożeniu i ponownie po kilkugodzinnej hodowli *in vitro*) do transferu zakwalifikowano 23 z 24 zarodków. Badania biorecipientów na cielność, wyko-



Tab. 1. Wyniki pozyskiwania oocytów i produkcji zarodków *in vitro*

Oceniane parametry	Numer dawczyni					Razem
	82 590	84 642	84 645	84 647	84 648	
Liczba nakłutych pęcherzyków	87	98	88	65	144	482
Liczba oocytów odzyskanych	25	51	53	29	74	232
% oocytów odzyskanych	28,7	52,0	60,2	44,6	51,4	48,1
Liczba oocytów prawidłowych	17	22	28	18	48	133
% oocytów prawidłowych	68,0	43,1	52,8	62,1	64,9	57,3
Liczba blastocyst zamrożonych	2	2	6	2	12	24

Tab 2. Zbiorcze wskaźniki pozyskiwania oocytów i produkcji zarodków *in vitro*

Liczba oocytów pozyskanych ogółem	232
Liczba oocytów prawidłowych	133
Procentowy udział oocytów prawidłowych	57,3
Średnia liczba oocytów przypadająca na jedną jałówkę	46,4 (3,6 na sesję)
Średnia liczba oocytów prawidłowych przypadająca na jedną jałówkę	26,6 (2,1 na sesję)
Liczba blastocyst ogółem	28
Liczba blastocyst zakwalifikowanych do zamrożenia	24
Procentowy udział blastocyst w stosunku do ogólnej liczby oocytów	12,1
Procentowy udział blastocyst w stosunku do liczby oocytów prawidłowych	21,1
Średnia liczba blastocyst przypadająca na jałówkę na 1 sesję	0,43

nywane w 6 do 8 tygodni po transferze wykazały 4 ciąży (33% cielności), w następstwie których urodziły się 4 cielęta.

W piśmiennictwie opisano szereg czynników wpływających na efektywność procedury OPU/IVP. Zwracano uwagę na takie parametry jak np. podciśnienie stosowane podczas aspiracji oocytów czy też średnicę (a nawet kształt ostrza) igły używanej podczas tej procedury. Odsetek pozyskanych oocytów wzrastał zwykle wraz ze wzrostem podciśnienia, ale równocześnie wzrastał odsetek oocytów nagich, uzyskiwanych bez komórek pęcherzykowych (8, 24). Ponieważ oocyty nagie z trudem osiągają dojrzałość mejotyczną w warunkach *in vitro*, w konsekwencji stosowania wyższego podciśnienia obniża się ogólny odsetek zarodków uzyskanych metodą OPU/IVP. Hasler i wsp. (11) kwalifikowali do dojrzenia oocyty otoczone przynajmniej jedną warstwą komórek pęcherzykowych. W niniejszych badaniach kwalifikowano do dojrzenia także oocyty nagie, których część, po drugim etapie oceny poddawano inseminacji *in vitro*. Takie podejście, zmierzające do maksymalizacji ogólnej liczby zapładnianych oocytów, stanowiło zapewne jedną z przyczyn rzutujących na względnie niski odsetek blastocyst uzyskanych w wyniku hodowli *in vitro* w niniejszym doświadczeniu.

Liczni autorzy zwracają uwagę na znaczne indywidualne różnice występujące pomiędzy dawczyniami. Różnice te dotyczą zarówno bezwzględnej liczby uzy-

skiwanych oocytów, odsetka oocytów prawidłowych jak też odsetka oocytów nagich (7, 12). Również w toku niniejszych badań stwierdzano znaczne różnice jakości (obecność, bądź brak komórek pęcherzykowych, ziarnistość cytoplazmy) i liczby oocytów w zależności od dawczyni, czy wreszcie liczby i odsetka uzyskanych zarodków (tab. 1). Z drugiej strony okazało się, że powszechnie występującym i trudniejszym do interpretacji zjawiskiem są znaczne różnice jakościowe oocytów uzyskiwanych od tej samej dawczyni w kolejnych pobraniach. Różnice te dotyczyły głównie obecności, bądź braku komórek pęcherzykowych otaczających oocyty. Komórki pobierane były identycznymi igłami i przy zbliżonych wartościach podciśnienia. Nie udało się wykazać wpływu operatora ani związku między jakością kompleksów komórki ziarniste-oocyt a od-

stępem od poprzedniego pobrania (3 lub 4 dni). Rozstrzygnięcie dylematu, w jakim stopniu owe różnice mogą być spowodowane warunkami technicznymi metody, a w jakim zależą np. od stanu fizjologicznego dawczyni, wymaga dalszych wnikliwych badań.

Uzyskanie w niniejszym doświadczeniu 12,1% blastocyst zyskuje na znaczeniu jeśli pamięta się, że odsetek ten odnosi się do wszystkich uzyskanych oocytów. Odniesienie tej liczby zarodków do oocytów ocenionych jako prawidłowe, podnosi odsetek blastocyst niemal dwukrotnie (21%). Wskaźnik ten jest porównywalny z rezultatami badań innych autorów, którzy uzyskali 16,8% (24) i 18,6% (11) blastocyst. Nieco inną kwestią jest znaczny odsetek oocytów nieprawidłowych (43%) uzyskanych w niniejszych badaniach. Jest on wyższy niż u większości innych autorów, co jednak po części może być rezultatem bardziej wnikliwej, dwuetapowej oceny oocytów. Z drugiej jednak strony, Smorąg i wsp. (25) uznali jedynie 54,7% oocytów uzyskanych metodą OPU za przydatne do hodowli.

Poprawy wymagają rezultaty transferu zarodków. Uzyskane wskaźniki – 33% ciąży i 17% urodzonych cieląt nie są w pełni zadowalające, nawet jeśli brać pod uwagę niewielką skalę eksperymentu. Podobne wyniki uzyskiwano w warunkach krajowych (25) po transferze zarodków produkowanych *in vitro*, zarówno z oocytów pobieranych przyżyciowo (OPU, 21,5% cielności), jak i z oocytów uzyskiwanych z materiału poubojowego (23,5%). Z drugiej strony podkreślić

należy, że rezultaty niniejszych badań osiągnięte zostały w następstwie transferu zarodków poddanych kriokonserwacji. Nawet zamrażanie zarodków była uzyskiwanych *in vivo* powoduje zazwyczaj obniżenie odsetka uzyskiwanych zacielen. Tymczasem zarodki była uzyskiwane *in vitro* są mniej odporne na zamrażanie niż zarodki wyłukiwane w analogicznym stadium rozwojowym z macicy dawczyń (9, 12, 14, 17, 18, 22). Hasler i wsp. (12) uzyskali 42% zacielen po transferze zamrożonych zarodków *in vitro*, a 59% po transferze zarodków nie poddanych kriokonserwacji. Podobny rezultat – od 38 do 42% zacielen uzyskano po transferze zamrożonych zarodków *in vitro* w Holandii (29). Uważa się, że zarówno uzyskiwany odsetek jak i jakość zarodków produkowanych *in vitro* w tym także ich odporność na zamrażanie, zależą w dużym stopniu od zastosowanych warunków inkubacji (18). Szczególnie istotny wydaje się skład pożywki hodowlanej używanej w kolejnych etapach hodowli zarodków. Zwraca się przy tym uwagę np. na rolę surowicy płodowej (FCS). Uchodzi ona za istotny czynnik podnoszący efektywność metod hodowli rozumianą jako odsetek uzyskiwanych zarodków, ale równocześnie obarcza się FCS winą za słabszą przeżywalność zarodków kriokonserwowanych (13, 27). Istotne znaczenie dla wyników kriokonserwacji mogą mieć ponadto rodzaj komórek warstwy odżywczej czy poziom tlenu w atmosferze inkubatora rzutujący na zawartość wolnych rodników w pożywce hodowlanej. Ze względu na brak wystarczającej liczby biorecipientów nie udało się nam wykonać transferów zarodków świeżych (tzn. nie poddanych kriokonserwacji). Niniejsze wyniki nie dają więc podstaw do oceny szans rozwojowych zarodków świeżych. Można jedynie zakładać, że byłyby wyższe. Jednak odpowiedzi na tę kwestię dostarczyć mogą tylko dalsze badania. Z drugiej strony warto zauważyć, że dotychczasowe badania prowadzone w warunkach krajowych ustępują badaniom zagranicznym pod względem liczby i odsetka cieląt uzyskanych metodami OPU/IVP, głównie z powodu małej liczebności zwierząt używanych w Polsce do tego typu, dość kosztownych doświadczeń. Dla porównania, Galli i wsp. (9) wykonywali przez 3 kolejne lata (1997-1999) 983, 1266 i 1071 zabiegów OPU uzyskując odpowiednio 8300, 10 402 i 11 041 oocytów.

Reasumując, wydaje się, że przedstawione wyniki badań pozwalają na umiarkowany optymizm w odniesieniu do możliwości praktycznego wykorzystania metody OPU/IVP w rozrodzie bydła w Polsce. Jednak w obecnych warunkach ekonomicznych szansa na realne zainteresowanie tą metodą rodzimych hodowców bydła wydaje się znikoma.

## Piśmiennictwo

- Avery B., Brandenhoff H. R., Greve T.: Development of in vitro matured and fertilized bovine embryos, cultured from days 1-5 post insemination in either Menezzo-B2 medium or in HECM-6 medium. *Theriogenology* 1995, 44, 871-878.
- Broadbent P. J., Dolman D. F., Watt R. G., Smith A. K., Franklin M. F.: Effect of frequency of follicle aspiration on oocyte yield and subsequent superovulatory response in cattle. *Theriogenology* 1997, 47, 1027-1040.
- Bungratz L., Lucas-Hahn A., Rath D., Niemann H.: Collection of oocytes from cattle via follicular aspiration aided by ultrasound with or without gonadotropin pretreatment and in different reproductive stages. *Theriogenology* 1995, 43, 667-675.
- Callesen H., Greve T., Christensen F.: Ultrasonically guided aspiration of bovine follicular oocytes. *Theriogenology* 1987, 27, 217 abstr.
- Duszeńska A.M.: OPU-IVP-ET- najnowsza technika w rozrodzie bydła. *Przegl. Hod.* 1998, 66, 10-13.
- Duszeńska A. M., Reklewski Z., Wojdan J., Pieńkowski M., Modliński A. J.: Development of bovine embryos obtained by OVUM PICK-UP, IVM-IVF and IVC on VERO/BRL cell monolayers (mixed co-culture). *Theriogenology* 2000, 53, 294 abstr.
- Duszeńska A. M., Reklewski Z.: Izolacja oocytów od cielných jajówek techniką OPU. *Medycyna Wet.* 2001, 57, 41-43.
- Fry R. C., Niall E. M., Simpson T. L., Squires T. J., Reynolds J.: The collection of oocytes from bovine ovaries. *Theriogenology* 1997, 47, 977-987.
- Galli C., Crotti G., Notari C., Turini P., Duchi R., Lazzari G.: Embryos production by ovum pick up from live donors. *Theriogenology* 2001, 55, 1341-1357.
- Gogol P., Smorąg Z.: Metody uzyskiwania oocytów bydłowych i ich wykorzystanie do produkcji zarodków *in vitro*. *Medycyna Wet.* 1996, 52, 630-632.
- Hassler J. F.: In vitro culture of bovine embryos in Menezzo's B2 medium with or without coculture and serum: the normalcy of pregnancies and calves resulting from transferred embryos. *Anim. Reprod. Sci.* 2000, 60-61, 81-91.
- Hassler J. F., Henderson W. B., Hurlgen P. J., Jin Z. Q., McCauley A. D., Mower S. A., Neely B., Shuey L. S., Stokes J. E., Trimmer S. A.: Production, freezing and transfer of bovine IVF embryos and subsequent calving results. *Theriogenology* 1995, 43, 141-152.
- Holm P., Booth P. J., Schmidt M. H., Greve T., Callesen H.: High bovine blastocyst development in a static in vitro production system using SOFaa medium supplemented with sodium citrate and myo-inositol with or without serum-proteins. *Theriogenology* 1999, 52, 683-700.
- Kruij Th. A. M., Bevers M. M., Kemp B.: Environment of oocyte and embryo determines health of IVP offspring. *Theriogenology* 2000, 53, 611-618.
- Kruij Th. A. M., Boni R.: Repeated follicular oocyte recovery for bovine embryo production *in vitro*. *Proc. First European Conference on Progress in Embryo Technology and Genetic Engineering in Cattle and Sheep Breeding*, Kraków, 1994, 117-126.
- Kruij Th. A. M., Boni R., Wurth Y. A., Roelofs M. W. M., Pieterse M. C.: Potential use of ovum pick-up for production and breeding in cattle. *Theriogenology* 1994, 42, 675-684.
- Leibo S. P., Loskutoff N. M.: Cryobiology of in vitro-derived bovine embryos. *Theriogenology* 1993, 39, 81-94.
- Massip A., Mermillod P., Dinnyes A.: Morphology and biochemistry of in vitro produced bovine embryos: implications for their cryopreservation. *Human Reprod.* 1995, 10, 3004-3011.
- Papis K.: Produkcja zarodków zwierząt gospodarskich *in vitro* – implikacje dla hodowli i hodowców bydła. *Przegl. Hod.* 1995, 63, 21-22.
- Papis K., Shimizu M., Izaike Y.: Factors affecting the survivability of bovine oocytes vitrified in droplets. *Theriogenology* 2000, 54, 651-658.
- Pieterse M. C., Kappen K. A., Kruij Th. A. M., Taverne M. A. M.: Aspiration of bovine oocytes during transvaginal ultrasound scanning of the ovaries. *Theriogenology* 1988, 30, 751-762.
- Pollard J. W., Leibo S. P.: Chilling sensitivity of mammalian embryos. *Theriogenology* 1994, 39, 561-567.
- Rosenkrans C.F., First N.L.: Effect of free amino acids and vitamins on cleavage and developmental rate of bovine zygotes *in vitro*. *J Anim Sci* 1994, 72, 434-437.
- Smorąg Z., Gogol P., Kuznetsov V.: Transwaginalna metoda uzyskiwania oocytów bydłowych: efektywność aspiracji, możliwości rozwojowe oocytów oraz zastosowanie w hodowli. *Biotechnologia* 1998, 2, 153-160.
- Smorąg Z., Gogol P., Kątska L., Jażdżewski J.: Rozwój zarodków bydłowych wyprodukowanych z oocytów uzyskanych metodą OPU. *Medycyna Wet.* 1999, 55, 317-320.
- Stubbings R. B., Armstrong D. T., Berialt R. A., Basrur P. K.: A method for aspirating bovine oocytes from small vesicular follicles: preliminary results. *Theriogenology* 1988, 29, 312 abstr.
- Thompson J. G., Allen N. W., McGowan L. T., Bell A. C. S., Lambert M. G., Tervit H. R.: Effect of delayed supplementation of fetal calf serum to culture medium of bovine embryo development *in vitro* and following transfer. *Theriogenology* 1998, 49, 1239-1249.
- Ullah M., Shimizu M., Izaike Y., Anwar M.: Survival of bovine oocytes after exposure to ethylene glycol. *Theriogenology* 1997, 47, 357 abstr.
- Wagendonk-de Leeuw A. M., Van, Mullart E., de Roos A. P. W., Merton J. S., den Daas J. H. G., Kemp B., de Ruigh L.: Effects of different reproduction techniques: AI, MOET or IVP, on health and welfare of bovine offspring. *Theriogenology* 2000, 53, 575-597.
- Whittingham D. G.: Embryo banks in the future of developmental genetics. *Genetics* 1974, 78, 395-402.