

Produkcja zarodków świń *in vitro* – nowsze aspekty

MARCIN JEZIORKOWSKI, PAWEŁ ANTOSIK, JĘDRZEJ M. JAŚKOWSKI

Katedra Weterynarii Rolniczej Wydziału Hodowli i Biologii Zwierząt AR, ul. Wojska Polskiego 52, 60-625 Poznań

Jeziorkowski M., Antosik P., Jaśkowski J. M.

In vitro production (IVP) of pig embryos: recent aspects

Summary

This review presents the evolution and current possibilities, state of knowledge and prospects for *in vitro* production of pig embryos. Development of this technology for use in the international pig industry remains slow. IVP systems are generally comprised of three stage-specific culture environments: *in vitro* oocyte maturation (IVM), *in vitro* fertilization (IVF), and *in vitro* embryo culture (IVC). Hormonal supplements, such as FSH, eCG or hCG and follicular fluid, are added to the IVM medium in order to mimic the *in vivo* situation and stimulate nuclear maturation of the oocyte. Important elements are the cumulus cells that play a protective and metabolic role in oocyte cytoplasmic maturation. Efficiency of cytoplasmic maturation includes the ability of the oocyte to block the penetration of more than one sperm and also to support the decondensation of the sperm head within the ooplasm of the fertilized oocyte. The main feature, widely perceived to be a distinctive trait in porcine IVF, is the high prevalence of polyspermic fertilization. In the great majority of IVP studies on the pig, oocytes are harvested from the ovaries of prepubertal gilts out of necessity, due to the relative unavailability of adult sow ovaries. In fact, penetration rates exceeding 80% are typically achieved in prepubertal gilt oocytes, but polyspermy rates rarely measure less than 40%. When using sow oocytes, polyspermy rates in the range of 10% are routinely achieved. Instead, a number of porcine IVP groups routinely obtain a blastocyst formation rate of about 30% from *in vitro* matured oocytes, which is on par with that achieved in other farm animal species. Parameter for evaluating the success of a given porcine IVP system are also not without their pitfalls. Parameters used to define embryo quality include blastocyst morphology, total and inner cell mass, cell number, chromosomal abnormalities, metabolism, gene expression and apoptosis. One parameter of particular interest in the pig is apoptosis. The nuclear apoptotic features can be visualized using relatively simple fluorescent DNA-labeling techniques called TUNEL.

Keywords: IVP, oocyte maturation

Proces produkcji zarodków *in vitro* składa się z trzech następujących po sobie etapów: dojrzewanie *in vitro* COC (IVM – *in vitro* maturation), zapłodnienie *in vitro* (IVF – *in vitro* fertilization) oraz hodowla *in vitro* zarodków (IVC – *in vitro* culture). Głównym zadaniem badaczy jest zapewnienie w wszystkich etapach procesu odpowiednich warunków pH, stałego ciśnienia osmotycznego, temperatury oraz składu mieszaniny gazów. U trzody chlewnej, w przeciwieństwie do innych gatunków zwierząt gospodarskich nie opracowano jak dotąd skutecznego protokołu produkcji zarodków – IVP (*in vitro* production). Jest to wynik szeregu odmienności indywidualnych jak również zjawiska polispermi u świń (17, 21).

W niniejszej pracy przedstawiono aktualny stan wiedzy na temat poszczególnych etapów produkcji zarodków *in vitro* u świń.

Pozyskiwanie, ocena i dojrzewanie COC *in vitro*

Dojrzewanie oocytów jest procesem złożonym, na który składa się szereg zmian biochemicznych zachodzących w jądrze i cytoplazmie. W warun-

kach *in vivo* gameta żeńska osiąga dojrzałość z chwilą zakończenia podziałów mejotycznych i wyrzutu LH do krwi. W momencie pęknięcia pęcherzyka Graafa i wznowienia podziałów mejotycznych mają miejsce charakterystyczne procesy, takie jak: kondensacja chromatyny, zanikanie pęcherzyków płciowych i organizowanie się chromosomów na powierzchni wrzeciona podziałowego metafazy pierwszej. Po wyrzuceniu pierwszego ciała kierunkowego oocyt wchodzi w fazę drugiego podziału mejotycznego, umożliwiającą dojrzewanie jądra, które przebiega równocześnie ze zmianami zachodzącymi w cytoplazmie. Proces ten jest niezbędny do prawidłowego przebiegu dekapitacji nasienia podczas zapłodnienia. Dojrzewanie cytoplazmy i jądra przebiega równolegle, a ich maksymalna synchronizacja w warunkach *in vitro* stwarza potencjalne możliwości zwiększenia efektywności tego procesu (1).

Wybór i selekcja odpowiednich rozmiarów pęcherzyków jajnikowych (o średnicy powyżej 3 mm) pozwala na pozyskiwanie dojrzałych oocytów o dużej zdolności do podjęcia i zakończenia mejozy (18, 19). Oocyty

pozyskiwane od niedojrzałych płciowo loszek gwarantują wyższy odsetek zarodków osiągających stadium blastocysty w porównaniu do oocytów pozyskiwanych od wieloródek. Należy zaznaczyć, że oocyty pozyskiwane od niedojrzałych płciowo samic bydła i owiec oceniano negatywnie (13, 24).

W warunkach laboratoryjnych pozyskiwanie kompleksów oocyt-wzgórek jajonośny (COC – cumulus-oocytes complexes) odbywa się poprzez cięcie w plastry jajnika lub nakłucie i aspirację pęcherzyków jajnikowych. Pozyskane w ten sposób komórki jajowe znajdują się w stadium G2 pierwszego podziału mejotycznego. Znaczne zróżnicowanie pod względem zaawansowania poszczególnych etapów mejozy znajduje jednak swoje odzwierciedlenie w mało powtarzalnych wynikach IVM. W celu zwiększenia stabilności procesu dojrzewania *in vitro* oocytów świń wykorzystywano oocyty we wcześniejszym stadium podziału (diktioten profazy i metafazy pierwszego podziału mejotycznego). Dowiedziono, że zarodki uzyskane z oocytów w profazie i metafazie I wykazują taką samą zdolność do osiagania stadium blastocysty jak zarodki hodowane z oocytów znajdujących się w stadium metafazy drugiej. Nie odnotowano też istotnych różnic odnośnie do liczby komórek węzła zarodkowego (ICM) w porównaniu do liczby komórek trofoblastu (TE) (26).

Warunkiem powodzenia hodowli *in vitro* oocytów jest uzyskanie pełnej dojrzałości cytoplazmy. Konsekwencją tej dojrzałości jest wykształcenie przez zarodek męskiego przedjądrza. Dojrzałość ta jest niezbędna do wytworzenia bloku polispermii oraz przebiegu dekondensacji nasienia w ooplazmie oocytu (7). Stopień dojrzałości cytoplazmy jest niezbędnym warunkiem do osiągnięcia zdolności komórki rozrodczej do zapłodnienia i dalszego rozwoju zarodka. Kontrola przebiegu tego procesu jest możliwa poprzez dodatek hormonów (FSH, PMSG lub hCG) i płynu pęcherzykowego (8). Stosowana stymulacja hormonalna reguluje odbudowę aktyn cytoszkieletu w warstwie międzystrefowej i korowej oocytu oraz ma pośredni wpływ na zdolność oocytu do zapłodnienia i tworzenia zygoty (1, 8). Natomiast płyn pęcherzykowy stwarza optymalne warunki do rozwoju oocytu, umożliwiając osiągnięcie jego pełnej dojrzałości (31).

Dojrzewanie cytoplazmy oocytów świń w warunkach *in vitro* można przyspieszyć poprzez redukcję stresu tlenowego, który ma miejsce w momencie ich pozyskiwania z pęcherzyków (29, 30). Stężenie reaktywnego tlenu na poziomie komórkowym jest pośrednio kontrolowane przez enzymy, takie jak np. glutation, który chroni oocyt przed niepożądanymi efektami stresu tlenowego, aminokwasów dodatkowo zwiększa migrację aminokwasów oraz stymuluje syntezę białek i DNA (16, 25). Poziom tego enzymu w cytoplazmie można w warunkach laboratoryjnych zwiększać przez dodatek do pożywek aminokwasów i związków zawierających grupy tiolowe, takich jak: cyste-

ina, cystamina, glutamina, β -merkaptanol. Cennym ich źródłem jest także płyn pęcherzykowy (2, 10). Kolejnym czynnikiem stymulującym dojrzewanie jądra i cytoplazmy jest hodowla oocytu w współkulturze z komórkami somatycznymi lub dodatek stymulatorów wzrostu do pożywki (1).

Ważnym elementem w procesie dojrzewania jądra i cytoplazmy są komórki wzgórek jajonośny. Komórki te *in vivo* zapewniają kontakt pomiędzy oocytom a środowiskiem wewnętrznym pęcherzyka, natomiast w warunkach *in vitro* pomiędzy oocytom a pożywką. Ta wewnętrzna komunikacja jest możliwa dzięki tzw. mikrofilamentarnej projekcji międzystrefowej, w której udział biorą komórki wzgórek i wieńca promienistego (3). Komórki wzgórek uczestniczą również w procesie wychwytywania cysteiny przez oocyt, zmniejszając występowanie stresu oksydacyjnego. Współuczestniczą także w reakcji redukcji cystyny do cysteiny. Przypuszcza się, że komórki wzgórek mogą stabilizować także rozmieszczenie ziaren korowych w cytoplazmie oraz wspomagać migrację organelli komórkowych, takich jak mitochondria i retikulum cytoplazmatyczne (30). Bezpośredni transport substancji niezbędnych do wzrostu oocytu jest możliwy dzięki osłonce przejrzystej, która pełni w tym procesie rolę membrany plazmowej (28).

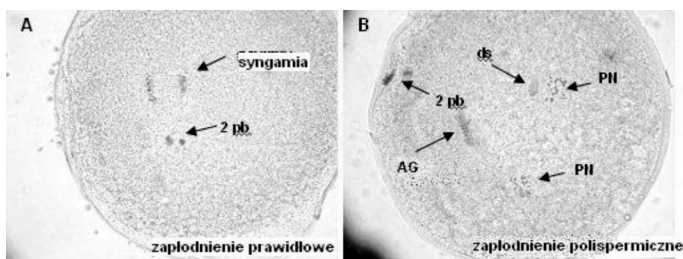
Do oceny stopnia dojrzałości jądra stosuje się proste metody barwienia, takie jak oceto-orcynową lub odczynnikiem DAPI (4,6-diamino-2-fenoloindol), podczas gdy dojrzałość cytoplazmy oceniana jest metodą pośrednią poprzez określenie stopnia rozwojowego blastocysty, liczbę komórek, zawartość glutationu oraz poziom rozwoju męskiego przedjądrza.

Zapłodnienie *in vitro*

W pozaustrojowym zapłodnieniu u świń (IVF) używa się wyłącznie plemników uprzednio poddanych procesowi kapacytacji. Zapłodnienie *in vitro* przeprowadza się w małych kroplach pożywki, w których umieszcza się dojrzałe oocyty i wprowadza następnie plemniki. O wyniku zapłodnienia w dużym stopniu decydują czynniki osobnicze, takie jak dobór dawcy nasienia i koncentracja plemników w nasieniu oraz warunki inkubacji: czas hodowli, temperatura i skład atmosfery.

Istotnym problemem podczas zapłodnienia *in vitro* jest zjawisko polispermii. Ma ono miejsce w momencie wniknięcia do komórki jajowej więcej niż jednego plemnika i jest wynikiem zakłócenia przebiegu reakcji bloku polispermii (17). W większości przypadków polispermia prowadzi do wczesnego obumarcia zarodka. Porównanie przebiegu zapłodnienia prawidłowego i polispermicznego przedstawiono na rycinie 1.

Przyczyny polispermii nie zostały dotychczas dokładnie poznane. Z ostatnich badań wynika, że występowanie wielozaplemnienia u świń może mieć związek z wiekiem dawczyni oocytów lub zbyt wczesnym pozyskiwaniem ich z pęcherzyków (32). U niedojrza-



Ryc. 1. Porównanie procesu zapłodnienia prawidłowego i polispermicznego

Objaśnienia: A – prawidłowo zapłodniony oocyt z dwoma ciałkami kierunkowymi: żeńskim i męskim oraz garnitur chromosomowy biorący udział w procesie syngamii; B – zapłodniony polispermicznie oocyt z widocznymi dwoma ciałkami kierunkowymi i wystąpiła dodatkowa dekondensacja główki plemnika oraz silna agregacja chromosomów. (2 pb – 2 ciałka kierunkowe; ds – zdekonduowana główka plemnika; PN – przedjądrze, AG – agregacja chromosomów)

łych płciowo loszek odsetek zapłodnionych oocytów wynosił powyżej 80%, podczas gdy polispermia wystąpiła w ponad 40% przypadków. W oocytach pozyskanych od świń wieloródek polispermia występuje zaledwie w 10%, jednak odsetek zapłodnionych gamet żeńskich jest niski i wynosi od 40% do 50% (20, 23).

Ze względu na częstość występowania polispermii podczas IVF morfologiczna ocena jakości zarodka świni jest trudna i niejednoznaczna. Zygoty, w których wystąpiło wielozaplemnienie mogą wprawdzie osiągnąć stadium blastocysty, jednak ich żywotność po transferze do macicy biorecyj jest ograniczona. W 78% przypadków stwierdzono także niewłaściwą temu gatunkowi liczbę chromosomów oraz wolniejszy rozwój zarodków w porównaniu do zarodków powstałych w wyniku monospermicznego zapłodnienia (21).

Nowsze dane dowodzą, że zastosowanie dodatku płynu pęcherzykowego do pożywki ogranicza występowanie polispermii. Dowiedziono, również że płyn pęcherzykowy pozyskiwany ze średnich pęcherzyków silniej redukuje zjawisko polispermii niż dodatek surowicy płodów bydłych (FCS – fetal calf serum) odpowiednio o 18% w porównaniu do 48%. Uzupełnienie pożywki płynem pęcherzykowym mrożonym pozwala na ograniczenie zjawiska polispermii z 29% do 18%. Zastosowany dodatek płynu o stałym składzie uzyskanego z przetrzymywanych w warunkach *in vitro* jajowodów pochodzących od samic będących w fazie owulacji pęcherzykowej spowodował wzrost odsetka prawidłowych zapłodnień do 95% (13).

Występowanie polispermii istotnie zmniejsza również prawidłowa koncentracja plemników w dawce nasienia (5×10^6 plemników/ml), dodatek wydzieliny jajowodowej, glikoaminoglikonu, związków zawierających grupę tiolową oraz komórek wzgórka (4, 17, 35). Zastosowanie dawki nasienia o koncentracji plemników wyższej lub niższej od 5×10^6 na 1 ml powodowało odpowiednio zwiększenie lub zmniejszenie odsetka błędnych zapłodnień.

Stwierdzono, że sposób przeprowadzenia zapłodnienia pozaustrojowego ma wpływ na rozwój zarodka. Tradycyjnie do tego celu stosuje się metodę kropłową, polegającą na umieszczaniu w pożywce kolejno oocytów i plemników. W zapłodnienia *in vitro* u świń nowością jest zastosowanie słomek o pojemności 0,25 ml, do których wprowadza się pożywkę wraz z oocytami, nasieniem oraz pęcherzyk powietrza, a następnie pokrywa się słomkę olejem parafinowym i inkubuje się przez 6 godzin w temperaturze 39°C. Po zastosowaniu tej metody odsetek uzyskanych zygot był wyższy w porównaniu do metody tradycyjnej i wynosił odpowiednio: 96,4 i 72,9%. Zmniejszył się także odsetek zarodków zapłodnionych polispermicznie do 34,2%, podczas gdy w metodzie kropłowej wynosił 52,4% (17).

U loszek, mimo pewnej poprawy efektywności procesu IVF, poziom polispermii pozostaje jednak daleki od oczekiwanego i znacznie wyższy niż u loch.

Oocyty loszek, podobnie jak u cieląt i jagniąt-maciorek, wykazują istotne różnice pod względem ultrastruktury oraz przebiegu wewnątrzkomórkowych procesów biochemicznych w porównaniu do oocytów pochodzących od dojrzałych płciowo samic (23, 25). Ma to związek głównie z przemieszczaniem się organeli komórkowych (ziarna korowe i mitochondria) towarzyszących dojrzewaniu cytoplazmy. Z kolei oocyty pozyskiwane od dojrzałych płciowo loch posiadają szerszą przestrzeń dzielącą żółtko i osłonkę przejrzystą (PVS), co może ograniczać występowanie polispermii. Zastosowanie pożywki o niskim stężeniu NaCl korzystnie wpływa na rozmiary PVS (8).

Podejmowane próby obniżenia odsetka polispermicznych zygot poprzez usunięcie komórek wzgórka przed zapłodnieniem wprawdzie ograniczają wielozaplemnienie, jednak powodują również redukcję liczby zapłodnionych jaj (6, 11, 15).

Stosowana obecnie procedura IVF powinna pozwalać na osiągnięcie wysokiej liczby zapłodnionych oocytów (powyżej 80%), a tym samym ograniczyć do minimum zjawisko polispermii (poniżej 10%). Niestety, do dziś stosowane procedury nie pozwalają na osiągnięcie tak dobrych wyników.

Hodowla zarodków *in vitro*

Hodowla zarodków *in vitro* wymaga stworzenia odpowiednich warunków, które umożliwiają kolejne podziały mitotyczne. W praktyce jednak odsetek zarodków świń otrzymywanych w procesie ich produkcji *in vitro* osiagających stadium blastocysty wynosi zaledwie około 30% (33, 34). Fakt ten jest spowodowany uruchomieniem mechanizmu bloku rozwojowego pojawiającego w czterokomórkowym zarodku, który jest indukowany przez nieodpowiednie warunki środowiska zewnętrznego uniemożliwiające ekspresję genomu odpowiedzialnego za produkcję białek. W warunkach naturalnych blok rozwojowy pojawia się momencie przejścia zarodka do jamy macicy i trwa przez ważnie około 20-24 godzin (22). Odsetek zygot roz-

wijających się 48 godz. po IVF służy jako wskaźnik do określania potencjału rozwojowego zarodka.

Z badań nad rozwojem *in vitro* wynika, że czynnikiem decydującym o prawidłowym rozwoju zarodka podczas krótkotrwałej hodowli jest przede wszystkim dobór odpowiedniego składu pożywki. Najlepsze efekty uzyskano stosując pożywkę NCSU-23. Odsetek zarodków uzyskanych *in vitro*, hodowanych z użyciem tej pożywki, przekraczających blok rozwojowy wyniósł 57,3%, pozwalając na osiągnięcie stadium moruli i blastocysty w 42,5% przypadków (22). Czynnikiem umożliwiającymi kontynuowanie tego procesu do stadium wyklucia się z osłonki późnej blastocysty jest obecność surowicy bydlęcej BSA (bovine serum antigen) lub FCS, aminokwasów (tauryny i hypotauryny), dodatków energetycznych (glukozy) i witamin.

Dowiedziano, że zarodki zbudowane z blastomerów o wyrównanych rozmiarach mają większe szanse pełnego rozwoju niż te z cytoplazmą uległą defragmentacji, która często nie zawiera jądra. Wielkość uszkodzeń cytoplazmy jest ściśle skorelowana z nasileniem zjawiska polispermi. Blastocysty produkowane *in vitro* różnią się od pozyskanych *in vivo* mniejszą liczbą blastomerów. Stwierdzono, że sytuacja ta ma miejsce w środowisku o ograniczonej liczbie włókien aktywnych, co wskazuje na upośledzoną gospodarkę substancjami odżywczymi w cytoplazmie. Najprawdopodobniej ma to związek z niedojrzałością cytoplazmy oocyty (32). Stosowane obecnie metody oceny jakości zarodków uwzględniają następujące kryteria: budowy morfologicznej blastocysty, całkowitą liczbę komórek zarodka (TCN), liczbę komórek węzła zarodkowego (ICM), kinetykę procesu rozwojowego, zdolność przeżyciową po kriokonserwacji, odstępstwa chromosomalne po IVF, przemiany metaboliczne, ekspresję genomu oraz procesy apoptozy (27). Parametry te pozwalają na wykazanie różnic pomiędzy zarodkami pozyskanymi *in vivo* a uzyskanymi na drodze IVP.

Szczególnie interesujące jest zjawisko apoptozy. W blastocystach pozyskanych *in vivo* liczba komórek apoptotycznych jest znikoma, względnie nie stwierdza się ich obecności, podczas gdy w zarodkach *in vitro* obserwuje się jej znaczne nasilenie. Proces ten może być inicjowany z zewnątrz, jak i z wewnątrz. Wewnętrzny proces apoptotyczny jest koordynowany przez mitochondria, a bodźcem do jego rozpoczęcia może być szereg czynników wyzwalających, takich jak: brak hormonu wzrostu, obecność substancji toksycznych, nadmiar wolnych rodników czy stres metaboliczny. Dowiedziano, że hormon wzrostu (GH) zwiększa liczbę otrzymanych drogą *in vitro* blastocyst oraz poprawia ich jakość. GH pozwala także na skrócenie czasu IVM, ograniczając tym samym częstotliwość zjawiska apoptozy (36, 37). W 6. dniu hodowli uzupełnionej dodatkiem GH średnica oraz objętość blastocelu w blastocystach sklasyfikowanych jako małe (pon. 180 μm), nie odbiegała od wartości otrzymanych dla zarodków hodowanych bez dodatku GH. W przy-

padku blastocyst sklasyfikowanych jako duże (pow. 180 μm) odnotowano wzrost objętości blastocelu o około 10%, który był spowodowany wzmożeniem transportu glukozy do zarodka przez pompę sodowo-potasową znajdującą się w błonie komórkowej komórek trofektodermy. Stwierdzono również, że niezależnie od dodatku GH liczba uzyskanych komórek zarodka była znacznie niższa w warunkach *in vitro* niż *in vivo* i wynosiła odpowiednio 40 i 51. Dodatek GH redukował także odsetek komórek dotkniętych apoptozą w blastocystach dużych, podczas gdy w grupie blastocyst małych odsetek ten był wyższy i wynosił odpowiednio 4,8 i 5,0 (14).

Zewnętrzna ścieżka przebiegu procesów apoptozy inicjowana jest wiązaniem liganda z receptorem, który oddziałuje bezpośrednio na białka wyzwalające apoptozę. Są one czynnikami proteolitycznymi powodującymi rozpad składników cytoszkieletu, takich jak aktyna (4). Uważa się, że ocenę jakości blastocyst, poprzez identyfikację komórek apoptotycznych, najlepiej przeprowadzać stosując metodę TUNEL (terminal deoxynucleotide transferase – mediated deoxyuridine triphosphate). Jest to prosta technika fluorescencyjnego znakowania fragmentowych odcinków DNA za pośrednictwem terminalnej transferazy deoksynukleotydydowej. Sugeruje się, że optymalnym terminem oceny zmian apoptotycznych jest 6. dzień hodowli (21). Hodowla trwająca dłużej może zwiększać ryzyko występowania zjawiska apoptozy. Interesujący jest fakt, iż w 5. dniu hodowli nie zaobserwowano żadnych sygnałów późniejszej śmierci komórki. Dowiedziano również związku pomiędzy fragmentacją cytoplazmy i jądra oraz wstrzymaniem rozwoju zarodka z apoptozą. Pierwsze niekorzystne zmiany pojawiają się najpierw w cytoplazmie, a dopiero potem w jądrze. Zmiany te regulują i/lub aktywują proces apoptozy. Stwierdzono, iż istnieje związek pomiędzy budową morfologiczną a zdolnościami rozwojowymi zarodka. Nieprawidłowości morfologiczne, takie jak: fragmentacja cytoplazmy, kondensacja chromatyny oraz wstrzymanie rozwoju są głównymi czynnikami przyczyniającymi się do śmierci komórki – apoptozy. U większości zarodków z uszkodzoną cytoplazmą i wstrzymanym rozwojem stwierdzono również kondensację chromatyny. Odsetek zarodków, w których wystąpiły omawiane nieprawidłowości ulegał zmianom podczas hodowli i wynosił w 6. dniu jej trwania 41,4, 1,3, 75,0%, w 7. dniu 45,3, 7,5, 100%, a w 8. dniu 51,9%, 2,1%, 97% (9).

Reasumując, mimo zauważalnych postępów w badaniach nad poprawą efektywności produkcji zarodków świń *in vitro* nadal nie opracowano optymalnego modelu hodowli warunkującego wysoki odsetek rozwijających się blastocyst. Na obecnym etapie wiedzy istotna wydaje się dalsza optymalizacja składu pożywki zarówno do hodowli oocytów i zarodków, jak również ograniczenie niekorzystnego zjawiska polispermi. Coraz większego znaczenia nabiera opracowanie molekularnych metod oceny zarodka.

Piśmiennictwo

1. *Abeydeera L. R.*: In vitro production of embryos in swine. *Theriogenology* 2002, 57, 257-273.
2. *Abeydeera L. R., Wang W. H., Cantley T. C., Prather R. S., Day B. N.*: Presence of beta-mercaptoethanol can increase the glutathione content of pig oocytes matured in vitro and the rate of blastocyst development after in vitro fertilization. *Theriogenology* 1998, 50, 747-756.
3. *Allworth A. E., Albertini D. F.*: Meiotic maturation in cultured bovine oocytes is accompanied by remodeling of the cumulus cell cytoskeleton. *Dev. Biol.* 1993, 158, 101-112.
4. *Byrne A. T., Southgate J., Brison D. R., Leese H. J.*: Analysis of apoptosis in the preimplantation bovine embryo using TUNEL. *J. Reprod. Fertil.* 1999, 117, 97-105.
5. *Cotter T. G., Lennon S. V., Glynn J. G., Martin S. J.*: Cell death via apoptosis and its relationship to growth, development and differentiation of both tumour and normal cells. *Anticancer Res.* 2001, 10, 1153-1159.
6. *Coy P., Martinez E., Ruiz S., Vazquez J. M., Roca J., Gadea J.*: Environment and medium volume influence in vitro fertilisation of pig oocytes. *Zygote* 1993, 1, 209-213.
7. *Ducibella T.*: Biochemical and cellular insights into the temporal window of normal fertilization. *Theriogenology* 1998, 49, 53-65.
8. *Funahashi H., Cantley T. C., Stumpf T. T., Terlouw S. L., Day B. N.*: Use of low-salt culture medium for in vitro maturation of porcine oocytes is associated with elevated oocyte glutathione levels and enhanced male pronuclear formation after in vitro fertilization. *Biol. Reprod.* 1994, 51, 633-639.
9. *Hao Y., Lai L., Mao J., Im G. S., Bonk A., Prather R. S.*: Apoptosis and in vitro development of preimplantation porcine embryo derived in vitro or by nuclear transfer. *Biol. Reprod.* 2003, 69, 501-507.
10. *Jeong B. S., Yang X.*: Cysteine, glutathione and percoll treatments improve porcine oocyte maturation and fertilization in vitro. *Mol. Reprod. Dev.* 2001, 59, 330-335.
11. *Ka H. H., Sawai K., Wang W. H., Im K. S., Niwa K.*: Amino acids in maturation medium and presence of cumulus cells at fertilization promote male pronuclear formation in porcine oocytes matured and penetrated in vitro. *Biol. Reprod.* 1997, 57, 1478-1483.
12. *Kerr J. F., Wyllie A. H., Currie A. R.*: Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer* 1972, 26, 239-257.
13. *Khatir H., Lonergan P., Carolan C., Mermillod P.*: Prepubertal bovine oocyte: a negative model for studying oocyte developmental competence. *Mol. Reprod. Dev.* 1996, 45, 231-239.
14. *Kidson A., Rubio-Pomar F. J., a van Knegsel H. T., a van Tol K., Hazleger W., Ducro-Steeverink D. W. B., Colenbrander B., Dieleman S. J., Bevers M. M.*: Quality of porcine blastocysts produced in vitro in the presence or absence of GH. *Biol. Reprod.* 2004, 127, 165-177.
15. *Kikuchi K., Nagai T., Motlik J., Shioya Y., Izaike Y.*: Effect of follicle cells on in vitro fertilization of pig follicular oocytes. *Theriogenology* 1993, 39, 593-599.
16. *Lafleur M. V., Hoorweg J. J., Joenje H., Westmijze E. J., Retel J.*: The ambivalent role of glutathione in the protection of DNA against singlet oxygen. *Free Radic. Res.* 1994, 21, 9-17.
17. *Li Y. H., Ma W., Li M., Hou Y., Jiao L. H., Wang W. H.*: Reduced polyspermic penetration in porcine oocytes inseminated in a new in vitro fertilization (IVF) System: Straw IVF1. *Biol. Reprod.* 2003, 69, 1580-1585.
18. *Luca X., Martinez E. A., Roca J., Vazquez J. M. O., Gil M. A., Pastor L. M., Alabart J. L.*: Relationship between antral follicle size, oocyte diameters and nuclear maturation of immature oocytes in pigs. *Theriogenology* 2002, 58, 871-885.
19. *Lucas X., Martinez E. A., Roca J., Vazquez J. M., Gil M. A., Pastor L. M., Alabart J. L.*: Influence of follicle size on the penetrability of immature pig oocytes for homologous in vitro penetration assay. *Theriogenology* 2003, 60, 659-667.
20. *Marchal R., Feugang J. M., Perreau C., Venturi E., Terqui M., Mermillod P.*: Meiotic and developmental competence of prepubertal and adult swine oocytes. *Theriogenology* 2001, 56, 17-29.
21. *McCauley T. C., Mazza M. R., Didion B. A., Mao J., Wu G., Coppola G., Coppola G. F., Di Bernardino D., Day B. N.*: Chromosomal abnormalities in Day-6, in vitro-produced, pig embryos. *Theriogenology* 2003, 60.
22. *Medvedev S., Onishi A., Fuchimoto D.-I., Iwamoto M., Nagai T.*: Advanced in vitro production of pig blastocysts obtained through determining the time for glucose supplementation. *J. Reprod. Dev.* 2004, 50, 71-76.
23. *O'Brien J., Dwarto D., Ryan J. P., Maxwell W. M., Evans G.*: Comparison of in vitro maturation, in vitro fertilization, metabolism and ultrastructure of oocytes from prepubertal and adult pigs. *Reprod. Dom. Anim.* 2000, 35, 101-107.
24. *O'Brien J. K., Dwarto D., Ryan J. P., Maxwell W. M., Evans G.*: Developmental capacity, energy metabolism and ultrastructure of mature oocytes from prepubertal and adult sheep. *Reprod. Fertil. Dev.* 1996, 8, 1029-1037.
25. *Paz P. De, Sanchez A. J., De la Fuente J., Chamorro C. A., Alvarez M., Anel E., Anel L.*: Ultrastructural and cytochemical comparison between calf and cow oocytes. *Theriogenology* 2001, 55, 1107-1116.
26. *Somfai T., Kikuchi K., Medvedev S., Onishi A., Iwamoto M., Fuchimoto D. I., Ozawa M., Noguchi J., Kaneko H., Ohnuma K., Sato E., Nagai T.*: Development to the blastocyst stage of immature pig oocytes arrested before the metaphase-II stage and fertilized in vitro. *Anim. Reprod. Sci.* 2005.
27. *Soom Van A., Boerjan M.*: Assessment of mammalian embryo quality: Kluwer Academic Publishers, Dordrecht 2002.
28. *Tanghe S., Van Soom A., Nauwynck H., Coryn M., De Kruif A.*: Minireview: Functions of the cumulus oophorus during oocyte maturation, ovulation, and fertilization. *Mol. Reprod. Dev.* 2002, 61, 414-424.
29. *Tatemoto H., Ootaki K., Shigeta K., Muto N.*: Enhancement of developmental competence after in vitro fertilization of porcine oocytes by treatment with ascorbic acid 2-O-alpha-glucoside during in vitro maturation. *Biol. Reprod.* 2001, 65, 1800-1806.
30. *Tatemoto H., Sakurai N., Muto N.*: Protection of porcine oocytes against apoptotic cell death caused by oxidative stress during in vitro maturation: role of cumulus cells. *Biol. Reprod.* 2000, 63, 805-810.
31. *Vatzias G., Hagen D. R.*: Effects of porcine follicular fluid and oviduct-conditioned media on maturation and fertilization of porcine oocytes in vitro. *Biol. Reprod.* 1999, 60, 42-48.
32. *Wang W. H., Abeydeera L. R., Han Y. M., Prather R. S., Day B. N.*: Morphologic evaluation and actin filament distribution in porcine embryos produced in vitro and in vivo. *Biol. Reprod.* 1999, 60, 1020-1028.
33. *Wang W. H., Day B. N.*: Development of porcine embryos produced by IVM/IVF in a medium with or without protein supplementation: effects of extracellular glutathione. *Zygote* 2002, 10, 109-115.
34. *Wei Z., Park K. W., Day B. N., Prather R. S.*: Effect of epidermal growth factor on preimplantation development and its receptor expression in porcine embryos. *Mol. Reprod. Dev.* 2001, 60, 457-462.
35. *Yoshioka K., Suzuki Ch., Itoh S., Kikuchi K., Iwamura S., Rodriguez-Martinez H.*: Production of piglets derived from in vitro-produced blastocysts fertilized and cultured in chemically defined media: Effects of theophylline, adenosine, and cysteine during in vitro fertilization. *Biol. Reprod.* 2003, 69, 2092-2099.
36. *Zimmermann K. C., Bonzon C., Green D. R.*: The machinery of programmed cell death. *Pharmacol. Ther.* 2001, 92, 57-70.
37. *Zimmermann K. C., Green D. R.*: How cells die: apoptosis pathways. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2001, 108, 99-103.

Adres autora: mgr inż. Marcin Jeziorkowski, ul. Św. Jerzego 9A/7, 61-546 Poznań; e-mail: marjezo@wp.pl