

Wybrane aspekty dojrzewania oocytów świni w warunkach fizjologicznych i pozaustrojowych

TOMASZ STANKIEWICZ, BARBARA BŁASZCZYK, JAN UDAŁA

Katedra Rozrodu Zwierząt Wydziału Biotechnologii i Hodowli Zwierząt AR, ul. Doktora Judyma 6, 71-466 Szczecin

Stankiewicz T., Błaszczuk B., Udała J.

Selected aspects of pig oocytes maturation *in vivo* and *in vitro*

Summary

Oocytes attain developmental competence as a result of their maturation, which gives them nuclear and cytoplasm maturity. In physiological conditions the developmental competencies of oocytes are achieved in the environment of ovarian follicles before ovulation. In *in vitro* conditions, however, this occurs in a culture medium which, for porcine oocytes, is generally a TCM-199 and NCSU-23 medium supplemented in specific proportions of amino acids, proteins, hormones, growth factors and follicular fluid. The specific nature of porcine oocytes is that it takes them almost twice as long to obtain nuclear and cytoplasm maturity as in the case of other species of farm animals. Moreover, a common problem of *in vitro* maturation is the absence of normal cytoplasm maturity. Irregularities in translocation of mitochondria in the cytoplasm and transferring ions signals may also be observed. The absence of cytoplasm maturity of oocytes on the other hand reduces the possibility of male pronucleus (MPN) formation and development of zygotes to the blastocytes stage. Therefore, the latest studies concentrate on formulating methods of *in vitro* culture which enable normal development of porcine oocytes both in their nuclear as well as cytoplasm maturity.

Keywords: oocyte, pig

Pomimo znacznego postępu, jaki dokonał się w technikach hodowli *in vitro*, pozaustrojowe dojrzewanie oocytów świńskich nadal stwarza wiele trudności. Dlatego też w niniejszym opracowaniu przedstawiono specyfikę dojrzewania oocytów świni w warunkach fizjologicznych i wybrane problemy dotyczące dojrzewania tych gamet w warunkach pozaustrojowych.

Dojrzewanie oocytów świni *in vivo*

Oocyt ssaka jest jedną z najdłużej żyjących komórek w organizmie, a znaczenie tej komórki jest ściśle związane z przekazywaniem genomu następnym pokoleniom. Wyjątkowe cechy oocytu są także związane z jego szczególnym cyklem życia.

Oocyt formuje się w okresie życia płodowego i następnie jego rozwój jest zatrzymany w diplotenie mejozy aż do uzyskania przez samicę dojrzałości płciowej. W kategoriach cyklu komórkowego zablokowany w stadium diplotenu oocyt znajduje się w późnej fazie G_2 . U świni badania potwierdzające, że oocyt w tym stadium utrzymuje się aż do okresu owulacyjnego, przeprowadzili Spalding i wsp. (cyt. 24) już ponad 50 lat temu. Zablokowanie cyklu komórkowego w fazie diplotenu nie oznacza, że zatrzymane są inne procesy związane z różnicowaniem oocytu. Diplotenowe oocyty przechodzą okres wysokiej aktyw-

ności metabolicznej zwany fazą wzrostu. Charakterystyczna dla tego okresu jest wzmożona synteza oraz pobieranie metabolitów niezbędnych dla wypełnienia funkcji oocytu, związanych z zapłodnieniem i podtrzymaniem pierwszych etapów rozwoju zarodkowego, u świni co najmniej do stadium czterech blastomerów (2). W fazie wzrostu oocyty wielokrotnie zwiększają swoją objętość. Badania kinetyki wzrostu oocytów i pęcherzyków jajnikowych świni wykazały, że najintensywniejszy wzrost oocytu zachodzi w pęcherzykach przedantralnych, w których średnica oocytu zwiększa się z 30 do 100 μm (17).

W okresie przedowulacyjnym pod wpływem bodźców hormonalnych oocyt przechodzi proces dojrzewania, a następnie tuż przed owulacją zakończony zostaje pierwszy podział mejotyczny. Najważniejszym sygnałem umożliwiającym wznowienie mejozy jest przedowulacyjny pik LH (luteinizujący hormon), a najistotniejsze procesy związane z dojrzewaniem oocytu zachodzą podczas ostatnich dwóch dni przed owulacją (24). Jak donosi Hunter (5), wznowienie mejozy w oocytach świni następuje około 36-40 godzin po wyrzucie gonadotropin, zaś bezpośrednim czynnikiem umożliwiającym przełamanie bloku diplotenowego jest aktywacja czynnika MPF (maturation promoting factor), a w przypadku oocytów świni również MAPK

(mitogen-activated protein kinases). Proces mejozy ponownie zatrzymuje się na etapie podziału metafazy II i w tym stadium oocyt jest uwalniany podczas owulacji. Za zatrzymanie podziału mejotycznego odpowiedzialny jest cytoplazmatyczny czynnik CSF (cytostatic factor), który pojawia się tylko w mejotycznym cyklu komórkowym oocytów. Jego inaktywacja następuje po wnikięciu plemnika i dopiero wtedy możliwe jest dokończenie mejozy (5).

W wyniku dojrzewania oocyt uzyskuje tzw. kompetencję rozwojową, która oznacza jego dojrzałość jądrową i cytoplazmatyczną. Wielu autorów podkreśla, że uzyskanie przez oocyt kompetencji jest warunkiem prawidłowego zapłodnienia i rozwoju zarodkowego (2, 5). Prowadzone w tym zakresie prace wskazują ponadto, że kompetencja rozwojowa oocytu (kapacytacja oocytu) nabywana jest w środowisku pęcherzyka jajnikowego podczas stadiów poprzedzających owulację (2, 13).

Dojrzewanie jądrowe polega na procesach związanych z podziałem mejotycznym, a pierwszą widoczną oznaką jego rozpoczęcia jest kondensacja chromatyny i rozpuszczenie osłonki jądrowej oocytu, określane jako zanik pęcherzyka zarodkowego (GVBD – germinal vesicle break down) (5, 28). Wraz z rozpadem pęcherzyka zarodkowego rozpoczyna się faza M cyklu komórkowego, a jak donosi Hunter (5), zdolność przekroczenia fazy G_2 i kontynuowania mejozy oznacza kompetencję mejotyczną oocytu. Powyższy autor podkreśla również, że oocyty świni dla uzyskania dojrzałości jądrowej wymagają niemal dwa razy więcej czasu niż oocyty innych gatunków zwierząt gospodarskich. Motlik i Fulka w 1976 r. (cyt. 5) stwierdzili, iż procesy związane z przekształcaniem się pęcherzyka zarodkowego trwają 20-24 godziny, a stadium metafazy oocytu świni osiąga po 40-46 godzinach. Ponadto w oocytach świni, w odróżnieniu od oocytów mysich kondensacja chromatyny i zanik pęcherzyka zarodkowego poprzedzone są czynną transkrypcją i translacją. Transkrypcja zostaje zahamowana dopiero po rozpoczęciu dojrzewania, ale nadal w oocytach utrzymywana jest translacja. Zmienia się jednak profil jakościowy syntezy białek, pewne specyficzne białka przestają być syntetyzowane (np. białka osłonki przejrzystej), inne z kolei pojawiają się dopiero po rozpoczęciu dojrzewania mejotycznego – np. tkankowy aktywator plazminogenu (5).

Po rozpoczęciu dojrzewania i zaniku pęcherzyka zarodkowego w bezpośrednim sąsiedztwie kondensującej chromatyny dochodzi do formowania się mikrotubul i powstania wrzeciona (28). Wrzeciono metafazowe przez kilka godzin, aż do zainicjowania anafazy pozostaje нефunkcjonalne, co powoduje wydłużenie dojrzewania mejotycznego do czasu niezbędnego dla przeprowadzenia kompleksowych zmian obejmujących dojrzewanie cytoplazmatyczne. Równoległe z dojrzewaniem jądrowym zachodzą bowiem zmiany właściwości biochemicznych oocytu, składające się na

dojrzewanie cytoplazmatyczne. Charakter tych zmian pozostaje w dużym stopniu nieznanym, ale wiadomo, że obejmuje m.in. wzmożoną produkcję glutationu, przemieszczanie mitochondriów, zdolność magazynowania śródkomórkowego wapnia (13).

Pośrednim wskaźnikiem dojrzałości oocytu, zwłaszcza pod względem dojrzałości cytoplazmatycznej, może być jego wielkość (4, 19). Wskazują na to badania, w których stwierdzono, że oocyt mimo zakończenia pierwszego podziału mejotycznego nie nabywa całkowitej kompetencji aż do osiągnięcia ostatecznego rozmiaru (5). Według niektórych autorów (2, 4), wzrost oocytu nie kończy się w fazie wzrostu i oocyt powiększa swoją objętość nawet w pęcherzykach przedowulacyjnych.

Wzrost oocytu w dużym stopniu pozostaje pod kontrolą czynników produkowanych przez komórki ziarniste, zwłaszcza komórki wzgórka jajonośnego – komórki kumulusa (2). Spośród tych czynników podkreśla się czynnik stymulujący kolonie (CSF – colony-stimulating factor) i ligand dla receptora c-kit. Ponadto komórki wzgórka jajonośnego dostarczają do oocytu nukleozydy, aminokwasy, fosfolipidy i utrzymują w dojrzewającym oocycie równowagę jonową oraz stabilność mRNA (5). Dane przedstawione przez Gandolfi i wsp. (2) wskazują, że stabilność mRNA jest decydująca dla normalnego rozwoju, a jakiegokolwiek zakłócenie tego delikatnego procesu zmniejsza kompetencję rozwojową oocytu i w konsekwencji powoduje zahamowanie rozwoju zarodkowego. Udział pęcherzyka w kompetencji rozwojowej oocytu zaznacza się także poprzez tkankowe inhibitory metaloproteinaz (TIMP – tissue inhibitors of metalloproteinase), które uważane są za główne wydzielnicze produkty komórek ziarnistych i osłonkowych po przedowulacyjnym wyrzucie LH (5).

Powyższe dane wskazują, jak ważną rolę w dojrzewaniu oocytu odgrywa środowisko tworzone przez pęcherzyk jajnikowy. Dlatego też uzasadnione są badania nad fizjologicznie występującymi zmianami w składzie płynu pęcherzykowego, jak również modyfikacje środowiska dojrzewania oocytu *in vitro*, które wciąż dostarczają nowych informacji o hormonalnych i pęcherzykowych czynnikach regulujących końcowe dojrzewanie oocytu.

Dojrzewanie oocytów świni *in vitro*

Pozaustrojowe dojrzewanie oocytów jest elementem składowym kompleksowej metody produkcji zarodków obejmującej pozyskiwanie oocytów, przeprowadzenie dojrzewania oocytów *in vitro* (IVM – *in vitro* maturation), zapłodnienie *in vitro* (IVF – *in vitro* fertilization) oraz hodowlę wyselekcjonowanych zygot (IVP – *in vitro* production). Jest ona wykorzystywana u wielu gatunków zwierząt (3, 8, 10, 19), aczkolwiek procedura ta jest gatunkowo specyficzna.

Źródłem gamet żeńskich wykorzystywanych do przeprowadzenia dojrzewania pozaustrojowego są nie-

dojrzałe oocyty, pozyskiwane najczęściej z jajników pochodzących od zwierząt bezpośrednio po ich uboju. W praktyce oocyty pozyskiwane są z pęcherzyków antralnych o średnicy od 2 do 6 mm, przy zastosowaniu kilku ogólnie przyjętych technik. Jedną z nich jest aspiracja zawartości pęcherzyka za pomocą strzykawki zaopatrzonej w igłę, która pozwala na uzyskanie od 30% do 60% oocytów w stosunku do liczby aspirowanych pęcherzyków. Wydajniejszą metodą jest izolacja i rozrywanie pęcherzyków pod kontrolą mikroskopu stereoskopowego. Użycie tej metody pozwala na uzyskanie praktycznie wszystkich oocytów zawartych w pęcherzykach, niemniej jednak duża pracochłonność oraz czasochłonność tej metody może w znacznym stopniu ograniczać jej przydatność. Oocyty pozyskuje się również poprzez nacinanie powierzchni jajnika, uzyskując w ten sposób nawet 3-krotnie większą liczbę oocytów w porównaniu z metodą aspiracji (7). Oocyty uzyskane tym sposobem mogą jednak pochodzić z pęcherzyków o zbyt małej średnicy, co może hamować ich rozwój *in vitro*. Liczne dane wskazują bowiem na zależność między kompetencją rozwojową oocytu a wzrostem pęcherzyka (12, 15, 19). Według Lucasa i wsp. (12), oocyty świni pozyskane z pęcherzyków o średnicy poniżej 2,2 mm w znacznie mniejszym stopniu wykazują kompetencję dla penetracji plemników niż oocyty z pęcherzyków o średnicy większej. Z badań przeprowadzonych przez Marchalą i wsp. (15) wynika natomiast, że spośród wszystkich oocytów znajdujących się w pęcherzykach poniżej 3 mm, 44% posiada już zdolność do podjęcia procesu mejozy. Niemniej jednak tylko niewielka liczba oocytów (3%) pochodzących z takich pęcherzyków jest zdolna rozwinąć się po zapłodnieniu do stadium blastocysty. Kolejnym czynnikiem warunkującym prawidłowe dojrzewanie oocytów jest również ich rozmiar. Jak podają Sun i Nagai (26), oocyty o średnicy mniejszej niż 90 µm nie są zdolne do podjęcia procesu mejozy w warunkach *in vitro*.

Optymalna średnica pęcherzyka i oocytu nie jest jednak gwarantem uzyskania oocytów o doskonałej jakości. Dlatego też oocyty muszą być poddawane szczegółowej analizie i selekcji pod względem morfologicznym. Prawidłowy, niedojrzały oocyt powinien charakteryzować się jednolicie granulowaną, bez zmian morfologicznych cytoplazmą oraz spoistą warstwą komórek wzgórką jajonośnego. Taka postać oocytu jest określana jako kompleks oocyt-kumulus (cumulus oocyte complex – COC). Natomiast wszystkie odstępstwa od tych norm, a więc oznaki degeneracji cytoplazmy, rozproszenie, grudkowatość, a także zmniejszenie liczby warstw lub całkowity brak komórek wieńca promienistego są charakterystyczne dla procesu zaawansowanej atrezji oocytu i eliminują go z hodowli *in vitro*. Z dostępnych danych wynika, iż niemal we wszystkich badaniach obejmujących produkcję zarodków *in vitro* u świń, wykorzystywane są oocyty pochodzące od loszek będących w okresie osiągnięcia doj-

rzałości płciowej (11). Jednakże, jak wskazują badania przeprowadzone przez licznych autorów (6, 21, 26), wiek zwierząt może być czynnikiem wpływającym na rozwojowe kompetencje oocytów w warunkach pozaustrojowych. Badania Petersa i wsp. (21) wykazały, że zarodki pochodzących od loszek będących w okresie osiągnięcia dojrzałości płciowej, charakteryzują się obniżoną zdolnością rozwojową i większą wrażliwością na czynniki środowiska w warunkach *in vitro* w porównaniu do zarodków otrzymanych od loszek starszych. Badania Ikedy i Takahashiego (6) sugerują, iż niższa efektywność pozaustrojowego otrzymywania zarodków od niedojrzałych płciowo loszek może być spowodowana mniejszą zawartością cytoplazmy w oocytach. Jednakże badania Sherrera i wsp. (25) wykazały, iż oocyty pochodzące od loszek odznaczają się niższym wskaźnikiem zapłodnień polispermicznych niż oocyty pozyskane od loch. Niemniej jednak zarodki uzyskane w wyniku zapłodnienia oocytów pozyskanych od loch osiągają wyższe stadium rozwoju niż w zarodki uzyskane z zapłodnienia oocytów pozyskanych od loszek.

W procedurze IVM kluczowe jest zastosowanie odpowiednich mediów hodowlanych. W większości oparte są one na gotowych roztworach syntetycznych, aczkolwiek wymagają odpowiedniej suplementacji. Jedną z pożywek jest płyn TCM-199, będący roztworem soli Earla, uzupełnionym we właściwych proporcjach aminokwasami, związkami energetycznymi, białkami, hormonami i czynnikami wzrostu (9, 16, 29). Szeroko akceptowanym medium do dojrzewania *in vitro* oocytów świni jest również NCSU-23, pożywka opracowana przez Pettersa i Wellsa (22). Porównawcze badania nad tymi pożywkami przeprowadzone przez Marquesa i wsp. (16) wykazały podobną efektywność dojrzewania oocytów świni, niemniej wyniki uzyskane w procedurze wykorzystującej TCM-199 cechowały się większą powtarzalnością. Jednakże potencjał rozwojowy oocytów dojrzewających w mediach hodowlanych jest niższy od oocytów dojrzewających w warunkach fizjologicznych (1).

Dojrzewanie oocytu obejmuje zarówno jego jądro, jak i cytoplazmę. Dojrzewanie cytoplazmy ogrywa znaczącą rolę, gdyż, jak podają Marchal i wsp. (14), brak rozwojowych kompetencji w dojrzewaniu cytoplazmatycznym może zakłócić cały proces nawet przy jednoczesnym prawidłowym dojrzewaniu jądra. Zjawisko niedojrzałości cytoplazmatycznej oocytów świni poddanych dojrzewaniu *in vitro* jest często spotykane. Wynika ono z zaburzeń w przemieszczaniu mitochondriów w cytoplazmie, nieprawidłowości w transporcie sygnałów, jonów, zwłaszcza wapniowych. Z badań przeprowadzonych przez Niwa (18) wynika ponadto, że brak cytoplazmatycznego dojrzewania oocytu jest później odzwierciedlony w obniżonych możliwościach kształtowania się męskiego przedjądra (MPN – male pronucleus) i rozwijaniu się zygoty do stadium blastocysty.

Media hodowlane uzupełniane są również płynem pęcherzykowym. Stwierdzono, że zarodki uzyskane z oocytów hodowanych w pożywkach wzbogaconych płynem folikularnym wykazują większy potencjał rozwojowy (23, 30). Rath i wsp. (23) stwierdzili, iż świński płyn pęcherzykowy (pFF – porcine follicular fluid) dodawany do medium IVM korzystnie wpływa na wznowienie mejozy i formowanie MPN. Natomiast Yoshida i wsp. (30) dowiedli, iż dodatek pFF do medium IVM warunkuje prawidłowe podziały mitotyczne zygoty i jest istotnym czynnikiem ograniczającym zjawisko polispermii. Niektórzy autorzy podjęli też próbę określenia wpływu niektórych związków antyoksydacyjnych na pozaustrojową hodowlę oocytów. Park i wsp. (20), dodając do mediów hodowlanych dysmutazę ponadtlenkową, wykazali jej korzystny wpływ na formowanie się męskiego i żeńskiego przedjądra. Dodatek tego enzymu do medium zarówno w czasie dojrzewania, jak również podczas zapłodnienia efektywnie wspomagał tworzenie się tych struktur w zapłodnionych oocytach świni.

Pozaustrojowe dojrzewanie oocytów przebiega w różnym czasie, charakterystycznym dla danego gatunku. U świń czas trwania tego procesu wynosi około 48 godzin (15). Wizualnymi wyznacznikami dojrzałości oocyty są: obecność pierwszego ciała kierunkowego w przestrzeni okołozółtkowej oraz widoczna ekspansja komórek wzgórka jajonośnego (29). Jednocześnie są one kryteriami promującymi do dalszej procedury właśnie te oocyty, które dają największe prawdopodobieństwo pomyślnego przeprowadzenia zapłodnienia pozaustrojowego i uzyskania prawidłowych zarodków.

Spośród wszystkich gatunków zwierząt gospodarskich w zakresie metod pozaustrojowego pozyskiwania zarodków najmniejszy postęp uczyniono u świń. Dlatego też opracowanie takich technik hodowli, które umożliwiałyby prawidłowy rozwój większej liczby zapłodnianych oocytów świni w warunkach pozaustrojowych oraz uzyskanie znacznej powtarzalności metody wydaje się niezbędne.

Piśmiennictwo

1. Beckmann L. S., Day B. N.: Effects of media NaCl concentration and osmolarity on the culture of early-stage pig embryos and the viability of embryos cultured in a selected superior medium. *Theriogenology* 1993, 39, 611-622.
2. Gandolfi F., Brevini T. A. L., Cillo F., Antonini S.: Cellular and molecular mechanisms regulating oocyte quality and the relevance for farm animal reproductive efficiency. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.* 2005, 24, 413-423.
3. Grabiec A., Faundez R., Max A., Tischner M.: Dojrzewanie in vitro oocytów kota domowego. *Medycyna Wet.* 2007, 63, 318-321.
4. Griffin J., Emery B. R., Huang I., Peterson C. M., Carrell D. T.: Comparative analysis of follicle morphology and oocyte diameter in four mammalian species (mouse, hamster, pig, and human). *J. Exp. Clin. Assist. Reprod.* 2006, 3, 2, 5-9.
5. Hunter M. G.: Oocyte maturation and ovum quality in pigs. *Rev. Reprod.* 2000, 5, 122-130.
6. Ikeda K., Takahashi Y.: Comparison of maturational and developmental parameters of oocytes recovered from prepubertal and adult pigs. *Reprod. Fertil. Dev.* 2003, 15, 215-221.
7. Kątska L.: Comparison of two methods for recovery of ovarian oocytes from slaughter cattle. *Anim. Reprod. Sci.* 1984, 7, 461-463.
8. Kątska K., Kania G., Ryńska B., Gajda B., Smorąg Z.: Potomstwo po transplantacji zarodków kozich pochodzących z dojrzewających i zapłodnianych in vitro oocytów. *Medycyna Wet.* 2002, 58, 462-463.
9. Kątska-Książkiewicz L., Lechniak-Cieślak D., Korwin-Kossakowska A., Alm H., Ryńska B., Warzych E., Sosnowski J., Sender G.: Genetical and biotechnological methods of utilization of female reproductive potential in mammals. *Reprod. Biol.* 2006, 6, Suppl 1, 21-36.
10. Kowalska B. D., Okólski A.: Wspomagany rozród niedojrzałych płciowo samic. *Medycyna Wet.* 2007, 63, 151-154.
11. Lucas X., Martinem E. A., Roca J., Vazquez J. M., 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.
12. Lucas X., Martinem E. A., Roca J., Vazquez J. M., Gil M. L., 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.
13. Lucidi P., Bernabñ N., Turriani M., Barboni B., Mattioli M.: Cumulus cells steroidogenesis is influenced by the degree of oocyte maturation. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 2003, 1, 45.
14. Marchal R., Caillaud M., Martoriati A., Gerard N., Mermillod P., Goudet G.: Effect of growth hormone (GH) on in vitro nuclear and cytoplasmic oocyte maturation, cumulus expansion, hyaluronan syntheses, and connexins 32 and 43 expression, and GH receptor messenger RNA expression in equine and porcine species. *Biol. Reprod.* 2003, 69, 1013-1022. 17
15. Marchal R., Vigneron C., Perreau C., Bali-Papp A., Mermillod P.: Effect of follicular size on meiotic and developmental competence of porcine oocytes. *Theriogenology* 2002, 57, 1523-1532.
16. Marques M. G., Nicacio A. C., de Oliveira V. P., Nascimento A. B., Caetano H. V., Mendes C. M., Mello M. R., Milazzotto M. P., Assumpcao M. E., Visintin J. A.: In vitro maturation of pig oocytes with different media, hormone and meiosis inhibitors. *Anim. Reprod. Sci.* 2007, 97, 375-381.
17. Morbeck D. E., Esbenshade K. L., Flowers W. L., Britt J. H.: Kinetics of follicle growth in the prepubertal gilt. *Biol. Reprod.* 1992, 47, 485-491.
18. Niwa K.: Effectiveness of in vitro maturation and in vitro fertilization techniques in pig. *J. Reprod. Fertil. Suppl.* 1993, 48, 49-59.
19. Obarzanek-Fojt M., Sosnowski J.: Możliwości wykorzystania jaiówek jako dawczyń oocytów. *Medycyna Wet.* 2005, 61, 133-135.
20. Park C. K., Lee J. H., Cheng H. T., Yang B. K., Kim C. I.: Effect of superoxide dismutase (SOD) on pronucleus formation of porcine oocytes fertilized in vitro. *Theriogenology* 1997, 48, 1137-1146.
21. Peters J. K., Milliken G., Davis D. L.: Development of porcine oocytes in vitro: Effect culture medium and donor age. *J. Anim. Sci.* 2001, 79, 1578-1583.
22. Petters R. M., Wells K. D.: Culture of pig embryos. *J. Reprod. Fert. Suppl.* 1993, 48, 61-73.
23. Rath D., Niemann H., Tao T.: In vitro maturation of porcine oocytes in follicular fluid with subsequent effects on fertilization and embryo yield in vitro. *Theriogenology* 1995, 44, 529-538.
24. Rátky J., Torner H., Egerszegi I., Schneider F., Sarlos P., Manabe N., Brüssow K. B.: Ovarian activity and oocyte development during follicular development in pigs at different reproductive phases estimated by the repeated endoscopic method. *J. Reprod. Dev.* 2005, 51, 109-115.
25. Sherrer E. S., Rathbun T. J., Davis D. L.: Fertilization and blastocyst development in oocytes obtained from prepubertal and adult pigs. *J. Anim. Sci.* 2004, 82, 102-108.
26. Sun Q. Y., Nagai T.: Molecular mechanisms underlying pig oocyte maturation and fertilization. *J. Reprod. Dev.* 2003, 49, 347-359.
27. Sun Q. Y., Wu G. M., Lai L., Park K. W., Cabot R., Cheong H. T., Day B. N., Prather R. S., Schatten H.: Translocation of active mitochondria during pig oocyte maturation, fertilization and early embryo development in vitro. *Reproduction* 2001, 122, 155-163.
28. Suzuki H., Takashima Y., Toyokawa K.: Cytoskeleton organization of porcine oocytes aged activated electrically or by sperm. *J. Reprod. Dev.* 2002, 48, 293-301.
29. Yamauchi N., Nagai T.: Male pronuclear formation in denuded porcine oocytes after in vitro maturation in the presence of cysteamine. *Biol. Reprod.* 1999, 61, 828-833.
30. Yoshida M., Ishizaki Y., Kawagishi H., Bamba K., Kojima Y.: Effects of pig follicular fluid on maturation of pig oocytes in vitro and on their subsequent fertilizing and developmental capacity in vitro. *J. Reprod. Fertil.* 1992, 95, 481-488.