

LUCYNA KAŃSKA

artykuł przeglądowy

Izolacja i hodowla *in vitro* bydlęcych pęcherzyków jajnikowych

Zakład Fizjologii Rozrodu Zwierząt Instytutu Zootechniki, 32-083 Balice/Kraków

W fazie pęcherzykowej cyklu rujowego u bydła rozpoczyna się wzrost kilku pęcherzyków antralnych, z których z reguły tylko jeden zostanie następnie wyselekcjonowany do dalszego wzrostu, a w konsekwencji do owulacji, a pozostałe ulegną atrezji (20). Podanie egzogennych gonadotropin, tj. FSH lub PMSG, chroni rosnące pęcherzyki antralne przed atrezią prowadząc do zwiększenia liczby dojrzewających pęcherzyków, a w konsekwencji oocytów, a więc do superowulacji. Zasoby oocytów jajnikowych można również wykorzystywać poprzez hodowlę *in vitro* oocytów aspirowanych z niedojrzałych pęcherzyków antralnych. Aspiracji płynu pęcherzykowego można dokonywać *in vivo*, pod kontrolą USG, przy użyciu transwaginalnej sondy sprzężonej z igłą (technika określana w terminologii anglojęzycznej jako Ovum Pick-up czyli OPU) lub też poubojowo, po pobraniu jajników. Wszystkie te metody, zwiększające liczbę możliwych do uzyskania oocytów, przyczyniają się do pełniejszego wykorzystania potencjału rozrodczego samicy, niemniej jednak pozwalają one na wykorzystanie zaledwie niewielkiego odsetka gamet zawartych w jajniku.

Jajnik bydlęcy, podobnie jak innych ssaków, zawiera tysiące czy setki tysięcy pęcherzyków w różnych stadiach rozwoju, a mianowicie: nie rosnące pęcherzyki pierwotne, pęcherzyki przedantralne, w których zachodzi wzrost zarówno oocytu jak i ilości komórek ziarnistych oraz liczby warstw tych komórek otaczających oocyt, pęcherzyki antralne zawierające oocyty w pełni wyrosnięte (np. u gryzoni) lub bliskie osiągnięcia maksymalnej wielkości, otoczone kilkoma warstwami komórek ziarnistych i warstwą komórek osłonki pęcherzyka, z jamą pęcherzykową wypełnioną płynem pęcherzykowym. Najwcześniejsze, a równocześnie najliczniej reprezentowane, niezależnie od wieku samicy, stadium w rozwoju pęcherzyka stanowi pęcherzyk pierwotny. Zawiera on oocyt w stadium diktiotenu profazy I podziału mejotycznego, otoczony jedną warstwą płaskich komórek nabłonkowych będących prekursorami komórek ziarnistych. U bydła, pęcherzyk pierwotny osiąga średnicę 30-40 μm , oocyt 20-30 μm , a pęcherzyki te stanowią około 95% całej populacji pęcherzyków jajnikowych (32). U bydła, podobnie

jak u innych gatunków ssaków, pula pęcherzyków pierwotnych powstaje w czasie życia płodowego. Pierwsze rosnące pęcherzyki pojawiają się w jajniku około 140 dnia ciąży, a po 7,5 miesiącach ciąży w jajniku można spotkać wszystkie stadia rozwojowe pęcherzyka (42).

Stopień rekrutacji pęcherzyków pierwotnych do puli pęcherzyków rosnących jest mniej więcej stały w ciągu życia osobnika. Przemianie pęcherzyka pierwotnego w rosnący towarzyszy zarówno wzrost oocytu jak i zmiana kształtu oraz liczby otaczających go komórek pęcherzykowych – w wyniku tych przemian powstaje początkowo pęcherzyk pierwszorzędowy, w którym oocyt otoczony jest jedną warstwą kuboidalnych komórek ziarnistych, a następnie, w rezultacie proliferacji komórek ziarnistych warstwa ta staje się dwu- lub więcej warstwowa, a pęcherzyk określany jest jako drugorzędowy. Równocześnie rośnie również oocyt, a pomiędzy nim i warstwą ziarnistą pojawia się osłonka przejrzysta. Komórki stromy otaczające pęcherzyk drugorzędowy rozwijają się w komórki osłonki pęcherzyka (*theca*). Dalszemu wzrostowi pęcherzyka towarzyszy pojawienie się w obrębie warstwy ziarnistej początkowo niewielkich, a następnie stopniowo powiększających się przestrzeni wypełnionych płynem pęcherzykowym, które w końcu utworzą jedną wspólną jamę (*antrum*). Podczas gdy wzrost wcześniejszych stadiów rozwojowych, tj. pęcherzyków pierwotnych i przedantralnych, może zachodzić przy braku hormonów gonadotropowych, od momentu utworzenia *antrum* wzrost pęcherzyka znajduje się pod ścisłą kontrolą tych hormonów.

W oparciu o liczbę komórek ziarnistych w pęcherzykach różnych klas wielkości oraz okres czasu wymagany dla podwojenia tej liczby komórek wyliczono, że pęcherzyk rośnie od 0,13 do 0,67 mm około 27 dni, od 0,68 do 3,67 mm około 7 dni i od 3,68 do 8,56 mm około 8 dni (29). Na podstawie tych danych można również wyliczyć, że wzrost pęcherzyka pierwotnego do stadium przedowulacyjnego trwa u bydła od 80 do 100 dni (3).

Liczba pęcherzyków jajnikowych zależy od gatunku i wieku zwierzęcia, a także stadium ich rozwoju (17). W konsekwencji stałej rekrutacji pęcherzyków pierwotnych do puli rosnących liczba pę-

cherzyków przedantralnych i małych pęcherzyków antralnych maleje wraz z wiekiem. Tak więc najbogatszym źródłem pęcherzyków są jajniki młodych zwierząt. Pamiętać jednak należy o olbrzymiej zmienności między gatunkami, a także między osobnikami w obrębie gatunku. I tak, w bydłych jajnikach płodowych (w wieku 170 do 270 dni) liczba pęcherzyków waha się od 18 000 do 200 000, u nowo narodzonego cielęcia wynosi średnio około 235 000, przy czym w grupie 69 zwierząt obserwowano wahania od 0 do 724 000 (13), natomiast u krów 4-letnich średnio od około 77 000 (32) do 130 000 (13).

Ogromna większość (>99,9%) pęcherzyków jajnikowych ginie w wyniku atrezji w różnych stadiach rozwoju *in vivo* (30, 31), a tylko 0,05% dojrzeje do owulacji (4, 43). Możliwość uratowania tych pęcherzyków przed zniszczeniem poprzez uzyskiwanie bardzo wczesnych stadiów rozwojowych i długotrwałą hodowlę *in vitro* otworzyłaby wprost nieograniczone źródło gamet żeńskich, a potencjał gametotwórczy jajnika byłby maksymalnie wykorzystany. Do takiego właśnie celu zmierza rozwijany obecnie kierunek badań biotechnologicznych polegających na opanowaniu metod uzyskiwania i hodowli pęcherzyków przedantralnych (47).

Pierwsze prace nad uzyskiwaniem i hodowlą pęcherzyków przedantralnych przeprowadzano na myszach i szczurach, a pionierska publikacja na temat izolacji tych pęcherzyków została opublikowana przez Groba w 1964 r. (21). U myszy badania nad izolacją i hodowlą pęcherzyków przedantralnych doprowadziły do opanowania metod wzrostu i dojrzewania oocytów, wzrostu pęcherzyków z utworzeniem *antrum* (2, 10, 33), owulacji *in vitro* (2, 22), do uzyskania potomstwa po zapłodnieniu *in vitro* dojrzałych *in vitro* oocytów uzyskiwanych z pęcherzyków przedantralnych (10, 45), a nawet z pęcherzyków pierwotnych (12). Te pozytywne rezultaty uzyskane u myszy zachęcają do prowadzenia hodowli pęcherzyków przedantralnych z jajników zwierząt domowych, a przede wszystkim bydła.

Uzyskiwanie pęcherzyków przedantralnych

Pierwszym warunkiem niezbędnym dla opracowania skutecznego systemu hodowli pęcherzyków jest opanowanie metod ich uzyskiwania. Uzyskiwanie to jest zadaniem znacznie trudniejszym niż pobieranie niedojrzałych oocytów jajnikowych. Utrudnienia są spowodowane zarówno niewielkimi rozmiarami izolowanych pęcherzyków, ich delikatną strukturą, a tym samym podatnością na uszkodzenie, jak i wynikają z topografii jajnika, tj. lokalizacji pęcherzyków we włóknistej niekiedy stromie jajnikowej.

Metody enzymatyczne

Zastosowana przez Groba (21) technika izolacji pęcherzyków przedantralnych z jajników mysich i szczurzych przy pomocy enzymu proteolitycznego, pronazy, okazała się postępowaniem zbyt drastycznym, prowadziła bowiem do uszkodzenia błon komórkowych (28, 34, 37). Nicosia i wsp. (34) opracowali metodę znacznie łagodniejszego trawienia enzymatycznego fragmentów kory jajnika królika przy użyciu kollagenazy, która pozwalała na izolację morfologicznie i funkcjonalnie prawidłowych pęcherzyków. Metodę zastosowano następnie z powodzeniem dla uzyskiwania pęcherzyków przedantralnych z jajników innych gryzoni (10, 40, 48). Metody enzymatycznej izolacji pęcherzyków jajnikowych przy użyciu pronazy (21, 40), kollagenazy i trypsyny (5, 9, 19, 34, 46, 48) stosowano u różnych gatunków ssaków. Faktycznie prowadzą one do uzyskiwania nie pęcherzyków a oocytów otoczonych komórkami wzgórka jajonośnego, ponieważ większość komórek osłonki pęcherzyka i błony podstawnej ulega degradacji pod działaniem enzymów.

Mechaniczna izolacja pęcherzyków poprzez homogenizację kory jajnika w rozdrabniaczu tkanek

Jajniki zwierząt domowych mają bardziej włóknistą strukturę niż u gryzoni, co znacznie utrudnia albo wręcz uniemożliwia proces izolacji pęcherzyków gdy zastosuje się techniki uzysku używane u gryzoni. Opracowano więc metodę rozdrabniania tkanki jajnikowej, a ściślej kory jajnika, przy pomocy specjalnie skonstruowanego ostrza tnącego (24) lub rozdrabniacza tkanek, tzw. tissue chopper, tnącego tkankę na fragmenty o pożądanej długości (nie przekraczającej 1000 μm) (14). Rozdrobnioną korę jajnika poddaje się wielokrotnemu mechanicznemu rozpipetowywaniu w celu uwolnienia pęcherzyków, następnie filtracji przez siateczki o określonej wielkości porów i wreszcie wyszukuje się pęcherzyki, zawieszane w płynie fizjologicznym, przy użyciu mikroskopu odwróconego. Użycie tej techniki prowadzi do uzyskania mieszanej populacji pęcherzyków, o średnicy od 30 do 100 μm , która składa się z pęcherzyków pierwotnych, pierwszo- i drugorzędowych, zanieczyszczonej przez komórki stromy jajnika, krople lipidowe i krwinki. Narzuca to konieczność wielokrotnego przepłukiwania i segregacji (11, 14, 23, 24). Do istotnych mankamentów tej metody zaliczyć należy niemożność uzyskania większych pęcherzyków przedantralnych (o średnicy >100 μm) czy wczesnoantralnych. Ponadto, badania ultrastruktury wykonane w mikroskopie elektronowym wykazały znaczne obniżenie jakości morfologicznej oocytów uzyskanych przy użyciu tej techniki (Hulshof, informacja ustna).

Mikrodysekcja pęcherzyków jajnikowych

Izolacji większych pęcherzyków przedantralnych, czy też wczesnoantralnych, można dokonać jedynie przy pomocy mikrodysekcji, tzn. izolacji pęcherzyków poprzez ich wyłuskiwanie ze stromy jajnika przy użyciu cienkich igieł preparacyjnych, pod kontrolą mikroskopu stereoskopowego. W przypadku małych jajników o luźniejszej strukturze, np. myszy, dysekcji dokonuje się na całym jajniku, w przypadku większych i bardziej włóknistych, o spoistej strukturze, np. jajników bydłęcych, sporządza się cienkie skrawki z warstwy korowej, z których następnie pęcherzyki uwalnia się przy pomocy igieł preparacyjnych (18, 25, 38, 39). Mikrodysekcja nie wymaga stosowania żadnych enzymów, jej wydajność zależy oczywiście od sprawności manualnych wykonującego, po 2-3 godzinnych manipulacjach można uzyskać nawet około 50 pęcherzyków, a najmniejsze pęcherzyki, które udaje się izolować tym sposobem nie przekraczają na ogół średnicy 100-120 μm (25, 47).

Hodowla pęcherzyków przedantralnych

Jak już wcześniej wspomniano, techniki hodowli pęcherzyków zostały stosunkowo dobrze opanowane jedynie u gryzoni, a ściślej u myszy. Wynika to z faktu, że pełny rozwój pęcherzyka od momentu zapoczątkowania wzrostu aż do osiągnięcia stadium przedowulacyjnego trwa u tego gatunku 21 dni, czyli jest 4-5-krotnie krótszy niż u bydła. Dotychczasowe wiadomości na temat hodowli pęcherzyków i wynikające z nich spostrzeżenia i uogólnienia zostaną pokrótce przedstawione.

Pęcherzyki mogą być hodowane w 3 różnych systemach hodowli, a mianowicie: 1. w systemie trójwymiarowym, po zatopieniu wewnątrz kropli z agaru lub kolagenu (4, 16, 23, 40, 41, 46, 48); 2. w systemie dwuwymiarowym, tj. na specjalnych membranach czy w naczynkach pokrytych warstwą żelu kolagenowego lub innego substratu np. fibronektyny, lamininy lub agaru (10, 11, 16, 23, 38, 39); 3. bez substratu, w mikrokroplach pożywki, pod olejem mineralnym, w V-oczkach płytek 96-oczkowych (2, 25); 4. w hodowli tkankowej cienkich skrawków warstwy korowej – technika zastosowana w hodowli pęcherzyków pierwotnych (49).

W systemie 1, 2 i 4 stosuje się większe objętości pożywki, tj. od 350 μl (16) do 4 ml (12), którą podmienia się co 2-3 dni, natomiast hodowla w mikrokroplach (20 μl) wymaga codziennej wymiany pożywki. Ma to zapobiec nagromadzeniu metabolitów, a szczególnie jonów amonowych, które mogłyby toksycznie oddziaływać na rozwijające się pęcherzyki.

Substraty stosowane w dwu- lub trójwymiarowym systemie hodowli, tj. kolagen i fibronektyna to głów-

ne komponenty pozakomórkowej tkanki łącznej (26), natomiast laminina jest glikoproteidem obecnym w błonach podstawnych (27). Spełniają one rolę białek wiążących, których zadaniem jest: zabezpieczenie przed utratą pęcherzyków z hodowli, np. w czasie wymiany pożywki; utrzymanie kontaktu między komórkami; zachowanie trójwymiarowości komórek, a tym samym utrzymanie integralności pęcherzyka; a także wspomaganie przebiegu procesów metabolicznych (dostępności związków odżywczych z pożywki i wymiany gazowej). Mankamentem hodowli z użyciem białek wiążących jest trudność uwolnienia pęcherzyków czy oocytów po zakończeniu hodowli i wynikająca stąd konieczność użycia enzymów, np. kolagenazy. Trójwymiarowy system hodowli stosowano dla enzymatycznie izolowanych pęcherzyków (a właściwie kompleksów oocytów z komórkami ziarnistymi) uzyskanych z jajnika chomika (40, 41) i myszy (4, 46, 48) jak również małych pęcherzyków przedantralnych (do 100 μm) izolowanych mechanicznie z jajników bydłęcych (16, 23). W przypadku chomika pęcherzyki osiągały stadium antralne, natomiast nie obserwowano tego u myszy, nawet po transplantacji tak hodowanych pęcherzyków do kapsuły nerkowej (46). Większe pęcherzyki przedantralne (o średnicy >150 μm), zarówno mysie (2, 18) jak i bydłce (25) można z powodzeniem hodować bez obecności białek wiążących, w mikrokroplach pożywki. Hodowane w tych warunkach pęcherzyki mysie mogą owulować *in vitro* (18), natomiast bydłce mogą osiągać stadium antralne i przeżywać w hodowli nawet około trzech tygodni (25).

Pożywki stosowane w hodowli pęcherzyków bazują na gotowych płynach syntetycznych jak Tissue Culture Medium (TCM) 199, Minimal Essential Medium (MEM), Waymouth MB 752/1 Medium, Menzo B2 Medium. Uzupełnia się je związkami energetycznymi jak pirogronian (4, 5, 8, 10, 12, 23, 25, 39, 48) i glutamina (23, 25, 33). Ponadto dodaje się do pożywki surowicę płodów ciążących, insulinę, transferynę, selen, niekiedy również hypoksantynę i preparaty hormonalne, tj. FSH i estradiol-17 β . Dodatek FSH wyraźnie zwiększa proliferację komórek pęcherzykowych (23, 38, 39). Wykazano również, że hodowla całych pęcherzyków przedantralnych otoczonych komórkami osłonki, wymaga stosowania pożywki uzupełnionej surowicą i FSH, jeżeli zakłada się doprowadzenie pęcherzyka do stadium antralnego (2, 33). Hypoksantyna natomiast blokuje przebieg procesu mejozy, a więc zapobiega przedwczesnemu dojrzewaniu oocytu (6, 9, 50), a także wspomaga zachowanie łączności między oocytem i komórkami ziarnistymi redukując tym samym odsetek oocytów „nagich” tzn. pozbawionych otaczających je komórek (9).

Ponadto, podczas hodowli przedantralnych pęcherzyków jajnikowych obowiązują podobne wymogi

odnoszące się do warunków środowiskowych jak przy innych hodowlach komórkowych czy tkankowych, tj. zachowanie odpowiedniej temperatury, wilgotności, sterylności, warunków gazowych itp.

Jak to już na wstępie wspomniano, dotychczas największy postęp w omawianych badaniach osiągnięto u myszy. Pomimo jednak, że oocyty mysie rosły i uzyskują zdolność do pełnego dojrzewania w hodowli, duży ich odsetek ulega degeneracji, a wydajność metody nie jest jeszcze w pełni zadowalająca (2, 18, 44). Jak wynika z ostatnich badań Eppiga i O'Brien (12) 22% oocytów pochodzących z pęcherzyków pierwotnych osiągało dojrzałość, 42% dojrzałych oocytów ulegało zapłodnieniu i podziałom zarodkowym osiągając stadium 2-komórkowe, a mniej niż 2% tych zarodków rozwijało się do stadium blastocysty. Postęp, który udało się uzyskać w przypadku bydłych pęcherzyków przedantralnych jest niewspółmiernie skromniejszy. I tak, małe pęcherzyki przedantralne, o średnicy 30-70 μm , które hodowano w kolagenie w systemie trójwymiarowym, zachowywały do 7 dni zdolność wzrostu wykazując proliferację komórek pęcherzykowych (15, 23). Większe bydłe pęcherzyki przedantralne, o średnicy około 170 μm , hodowane w systemie dwuwymiarowym, w obecności kolagenu, wykazywały zarówno proliferację komórek pęcherzykowych jak i wzrost oocytów (38, 39), a hodowane w mikrokroplach osiągały nawet stadium antralne (25). Wprawdzie droga wiodąca do opanowania metody wydaje się jeszcze bardzo odległa i skomplikowana, to jednak należy wziąć pod uwagę, że badania u bydła zapoczątkowano zaledwie przed kilku laty (24), a koncentrowały się głównie na opanowaniu metod uzysku (14, 24) i wstępnych próbach hodowli (15, 16, 23, 25, 35, 38, 39). Biorąc pod uwagę, że badania z zakresu hodowli pęcherzyków przedantralnych budzą coraz większe zainteresowanie i obecnie obejmuje się nimi kolejne gatunki ssaków, np. psy i koty (1, 7, 36), można oczekiwać ich dalszego dynamicznego rozwoju. W połączeniu z technikami już stosunkowo dobrze opanowanymi, tj. z kompleksową metodą pozaustrojowej produkcji zarodków (z dojrzewających *in vitro* oocytów pochodzących z pęcherzyków antralnych, ich zapłodnienie *in vitro* oraz hodowla uzyskanych zarodków) metoda hodowli pęcherzyków wczesnych stadiów rozwojowych pozwalałaby na optymalne wykorzystanie potencjału gametotwórczego jajników dostarczając olbrzymiej liczby gamet czy zarodków tak cennych dla dalszego rozwoju biotechnologii rozrodu.

Piśmiennictwo

1. Bolamba D., Borden K. D., Durrant B. S.: Biol. Reprod. 54, suppl. 1, 109, 1996.
2. Boland N. I., Humpherson P. G., Leese H. J., Gosden R. G.: Biol. Reprod. 48, 798, 1993.
3. Britt J. H.: Bovine Practitioner 24, 39, 1991.

4. Carroll J., Whittingham D. G., Wood M. J., Telfer E. E., Gosden R. G.: J. Reprod. Fert. 90, 321, 1990.
5. Daniel S. A. J., Armstrong D. T., Gore-Langton R. E.: Gamete Res. 24, 109, 1989.
6. Downs S. M., Coleman D. L., Ward-Bailey P. F., Eppig J. J.: Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 82, 454, 1985.
7. Durrant B. S., Pratt N. C., Borden K. D., Bolamba D.: Biol. Reprod. 54, suppl. 1, 157, 1996.
8. Eppig J. J.: Dev. Biol. 60, 371, 1977.
9. Eppig J. J., Downs S. M.: Dev. Biol. 119, 313, 1987.
10. Eppig J. J., Schoeder A. C.: Biol. Reprod. 41, 268, 1989.
11. Eppig J. J., Telfer E. E.: Methods in Enzymology 225, 77, 1993.
12. Eppig J. J., O'Brien M. J.: Biol. Reprod. 54, 197, 1996.
13. Erickson B. H.: J. Anim. Sci. 25, 800, 1966.
14. Figueiredo J. R., Hulshof S. C. J., Van Der Hurk R., Ectors F. J., Fontes R. S., Nusgens B., Bevers M. M., Beckers J. F.: Theriogenology 40, 789, 1993.
15. Figueiredo J. R., Hulshof S. C. J., Van Der Hurk R., Nusgens B., Bevers M. M., Ectors F. J., Beckers J. F.: Theriogenology 41, 1333, 1994.
16. Figueiredo J. R., Hulshof S. C. J., Thiry M., Van den Hurk R., Bevers M. M., Nusgens B., Beckers J. F.: Theriogenology 43, 845, 1995.
17. Gosden R. G., Telfer E. E.: J. Zool. Lond. 211, 169, 1987.
18. Gosden R. G., Boland N. I., Spears N., Murray A. A., Chapman M., Wade J. C., Zhody N., Brown N.: Reprod. Med. Rev. 2, 129, 1993.
19. Greenwald G. S., Moor R. M.: J. Reprod. Fert. 87, 561, 1989.
20. Greenwald G. S., Roy S. K.: Follicular development and its control. W: Physiology of Reproduction, ed. Knobil E., Neil J. D., New York, Raven Press, 1994, s. 629.
21. Grob H. S.: Science 146, 73, 1964.
22. Hartshorne G. M., Sargent I. L., Barlow D. H.: Human Reprod. 9, 1003, 1994.
23. Hulshof S. C. J.: Bovine preantral follicles and their development *in vitro*. PhD thesis, Univ. Utrecht, Fac. Vet. Med., 1995.
24. Jewgenow K., Pitra C.: Reprod. Dom. Anim. 26, 281, 1991.
25. Kańska L., Ryńska B.: Proc. 12th Sci. Meeting AETE, Lyon. 150, 1996.
26. Kleinman H. K., Klebe R. J., Martin G. R.: J. Cell Biol. 88, 473, 1981.
27. Kleinman H. K., Cannon F. B., Laurle G. W., Hassell J. R., Aumailley M., Terranova V. P., Martin G. R., Dubols-Dalq M.: J. Cell Biochem. 27, 317, 1985.
28. Kono T.: J. Biol. Chem. 65, 1772, 1969.
29. Lussier J. P., Matton P., Dufour J. J.: J. Reprod. Fert. 81, 301, 1987.
30. Mariana J. C., Nguyen Huy N.: Ann. Biol. Anim. Bioch. Biophys. 13, 211, 1973.
31. Marion G. B., Gier H. B., Choudary J. B.: J. Anim. Sci. 27, 451, 1968.
32. Miyamura M., Kuwayama M., Hamawaki A., Eguchi Y.: Theriogenology 45, 300, 1996.
33. Nayudu P. L., Osborn S. M.: J. Reprod. Fert. 95, 349, 1992.
34. Nicosia S. V., Evangelista I., Batta S. K.: Biol. Reprod. 13, 423, 1975.
35. Nuttack F., Mermillod P., Massip A., Dessy F.: Theriogenology 39, 811, 1993.
36. Penfold L. M., Jewgenow K., Wildt D. E.: Biol. Reprod. 54, suppl. 1, 185, 1996.
37. Poste G.: Exp. Cell Res. 65, 359, 1971.
38. Ralph J. H., Wilmut I., Telfer E. E.: J. Reprod. Fert., abstract series 15, 6, 1995.
39. Ralph J. H., Wilmut I., Telfer E. E.: Biol. Reprod. 54, suppl. 1, 58, 1996.
40. Roy S. K., Greenwald G. S.: Biol. Reprod. 32, 203, 1985.
41. Roy S. K., Greenwald G. S.: J. Reprod. Fert. 87, 103, 1989.
42. Rüsse I.: Bibliotheca Anat. 24, 77, 1983.
43. Saumande J.: Rec. Vét. 167, 205, 1981.
44. Spears N.: Human Reprod. 9, 969, 1994.
45. Spears N., Boland N. I., Murray A. A., Gosden R. G.: Human Reprod. 9, 527, 1994.
46. Telfer E. E., Torrance C., Gosden R. G.: J. Reprod. Fert. 89, 565, 1990.
47. Telfer E. E.: Theriogenology 45, 101, 1996.
48. Torrance C., Telfer E. E., Gosden R. G.: J. Reprod. Fert. 87, 367, 1989.
49. Wandji S. A., Sršen V., Voss A. K., Eppig J. J., Fortune J. E.: Biol. Reprod. 54, suppl. 1, 97, 1996.
50. Warikoo P. K., Bavister B. D.: Fertil. Steril. 51, 886, 1989.

Adres autora: doc. dr hab. Lucyna Kańska, ul. Rejtana 8/4, 30-510 Kraków