

Czynniki wpływające na dojrzewanie oocytów psa w warunkach *in vitro*

RENATA WŁODARCZYK, DOROTA BUKOWSKA, JĘDRZEJ M. JAŚKOWSKI

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

Włodarczyk R., Bukowska D., Jaśkowski J. M.

Factors involved in the maturation of dog oocytes *in vitro*

Summary

Modern methods of supported reproduction find little application in relation to dogs. Although there is some progress in the production dogs embryos *in vitro*, results to date remain far from unsatisfactory. The main cause of failures is the low ability of dog oocytes to end the maturation process. The percentage of dog oocytes matured *in vitro* does not exceed 24% while in different animals species this percentage was, respectively, in goats, cattle and pigs 94%, 74.5% and 58%. There are a good deal of studies to make optimal composition of a maturation medium. Oocyte incubation in a medium with the addition of hCG resulted in a maturation of 31.7% oocytes, while in a medium without hCG this percentage was 23.3%. Estrogens are important in the process of meiosis resumption and oocyte maturation. The addition of these hormones to the medium caused a significant increase of the percentage of matured oocytes from 2.9% to 14.7% respectively in control and experimental groups. In a few studies the influence of such supplements as synthetic oviductal fluid (SOF) and the epithelial cells of oviduct on maturation dogs oocytes was definite. It seems that these supplements had no significant influence on initiation of meiosis resumption connected with oocyte maturation. However a positive influence on the enlargement of the percentage of matured dog oocytes was evoked by a culture condensation and an addition of cummulus cells.

Keywords: dog, oocyte, maturation

Nowoczesne metody wspomaganego rozrodu znajdują niewielkie zastosowanie w odniesieniu do psów. Wprowadzie notuje się nieznaczny postęp w produkcji zarodków psa w warunkach *in vitro*, lecz uzyskiwane rezultaty są, jak dotąd, niezadowalające. Główną przyczyną niepowodzeń jest niska zdolność oocytów psa do zakończenia procesu dojrzewania w warunkach laboratoryjnych (21, 23, 24). Odsetek oocytów psa dojrzewających w warunkach *in vitro* nie przekracza 24% (4). U innych gatunków zwierząt odsetek oocytów, które kończyły proces dojrzewania w warunkach *in vitro* wynosił, odpowiednio: u kóz 94%, bydła 74,5% i świń 58% (1, 25, 27).

Niski odsetek prawidłowo dojrzewających pozaustrojowo oocytów psa może być wynikiem stosowania pożywek opracowanych dla innych gatunków zwierząt, przeważnie dla bydła i owiec (12). Dojrzewanie oocytów u zwierząt przebiega dwustopniowo. Pierwszym etapem jest przełamanie fazy pęcherzyka zarodkowego (GV – germinal vesicle), w której jądro komórkowe ma postać tzw. pęcherzyka zarodkowego, drugim – osiągnięcie kompetencji do zakończenia dojrzewania w fazie metafazy II (13). U większości gatunków ssaków oocyt dojrzewa wewnątrz pęcherzyka

jajnikowego i w czasie owulacji znajduje się w stadium metafazy II mejozy (29). U psa proces ten przebiega odmiennie, oocyt opuszcza pęcherzyk jajnikowy w stadium profazy I mejozy, a zakończenie procesu dojrzewania zachodzi w jajowodzie i trwa do 5 dni (4). Standardowy skład pożywek stosowany w dojrzewaniu oocytów zwierząt gospodarskich w warunkach *in vitro* wydaje się niewystarczający w odniesieniu do hodowli oocytów psa.

Opracowanie protokołu produkcji zarodków psa *in vitro* (IVP – *in vitro* production), który umożliwiłby hodowlę zarodków na szeroką skalę wydaje się jednak nadal celem odległym. W tym świetle sukcesem było uzyskanie pierwszej ciąży z zarodków psa uzyskanych *in vitro*. Spośród 90 pozyskanych i zapłodnionych *in vitro* oocytów, trzy podjęły podziały i rozwinęły się do stadium dwukomórkowych zarodków. Zarodki te przeniesiono do macicy suki – biorczyń. Badanie ultrasonograficzne przeprowadzone dwadzieścia dni po przeprowadzeniu transferu wykazało obecność trzech woreczków płodowych, których średnica wynosiła od 4,4 do 5 mm, jednak po dwudziestu dwóch dniach ciąży zarodki te uległy resorpcji (6).

Przebieg cyklu rozrodczego i hormonalna regulacja okresu okołorujowego u psowatych

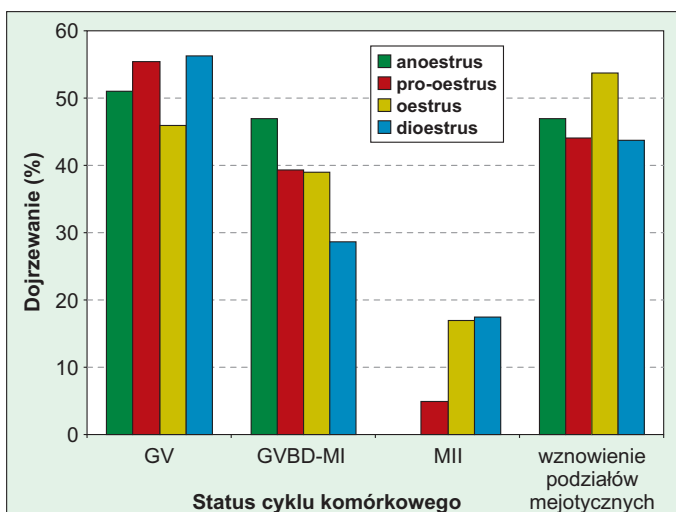
W cyklu rujowym suki, podobnie jak u innych ssaków, wyróżnić można cztery podstawowe fazy: *proestrus*, *oestrus*, *metoestrus* i *anoestrus*. Długość cyklu rozrodczego suki w zależności od czasu trwania fazy *anoestrus* wahać się może w granicach 5-12 miesięcy. Podczas fazy *anoestrus*, trwającej od 1-6 miesięcy, suka nie wykazuje aktywności rozrodczej, a stężenie jajnikowych hormonów sterydowych we krwi obwodowej utrzymuje się na poziomie bazalnym. Po fazie *anoestrus*, następuje trwająca około 10 dni faza pęcherzykowa (*proestrus*). Okres ten, charakteryzujący się obecnością krwistej wydzieliny w drogach rodnych, może rozpocząć się w czasie od 3 tygodni do 3 dni przed przedowulacyjnym wylewem LH. Wzrastającym na jajnikach pęcherzykom jajnikowym towarzyszy wzrost poziomu estradiolu we krwi od 10-20 pg/ml na początku *proestrus* do 50-100 pg/ml 1-2 dni przed przedowulacyjnym wylewem LH. Unikalną cechą profilu hormonalnego cyklu rozrodczego psowatych jest przedowulacyjna luteinizacja pęcherzyka jajnikowego, podczas której warstwa ziarnista pęcherzyka ulega proliferacji. W czasie *proestrus* poziom progesteronu osiąga wartość szczytową, równocześnie stężenie estradiolu gwałtownie się obniża. Owulacja następuje u suk w ciągu 1-2 dni po przedowulacyjnym wylewie LH. Powoduje to sytuację, w której u suk, odmiennie niż u innych gatunków ssaków, owulacja ma miejsce przy wysokim poziomie progesteronu i malejącym poziomie estrogenów. Także okres przebywania oocytów w jajowodzie jest okresem dominacji progesteronu. Być może, to zupełnie odmiennie tło hormonalne towarzyszące fizjologicznie pierwszemu okresowi rozwoju oocytu jest powodem trudności mających miejsce podczas dojrzewania oocytów tego gatunku w warunkach *in vitro*.

Wpływ fazy cyklu rujowego na dojrzewanie oocytów w warunkach hodowli *in vitro*

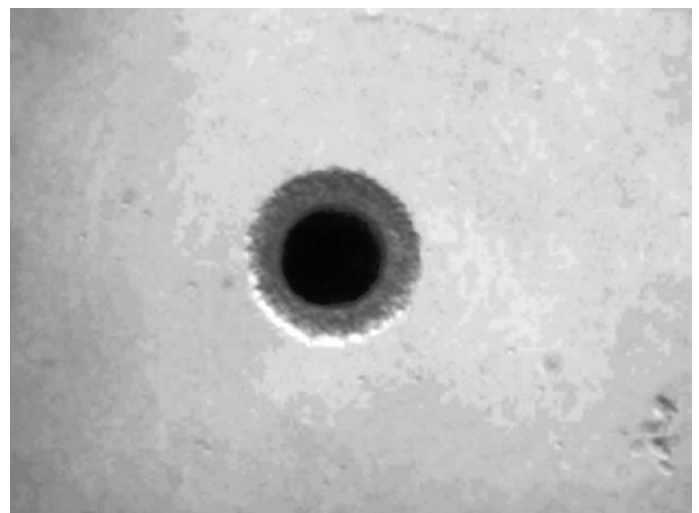
W nielicznych badaniach określano zależność pomiędzy fazą cyklu rujowego dawczyni oocytów a ich zdolnością do osiągnięcia pełnej dojrzałości w warunkach *in vitro*. Rycina 1 przedstawia wpływ fazy cyklu rujowego na wznowienie podziałów mejotycznych po 48 godzinach dojrzewania oocytów w warunkach *in vitro*. Wykazano, że oocyty pobrane od suk w fazie rujowej (*estrus*) oraz *dioestrus* posiadają większą zdolność do osiągnięcia metafazy II podczas dojrzewania w warunkach laboratoryjnych od oocytów pozyskiwanych od suk będących w fazie *anoestrus* (28).

Nie odnotowano znaczących różnic w przebiegu podziałów mejotycznych do stadium metafazy II pomiędzy oocytami pobieranymi od suk w fazie pęcherzykowej (5,4%), *dioestrus* (4,2%) i *anoestrus* (4,4%). Z drugiej strony, warto zaznaczyć, że odsetek oocytów kończących proces dojrzewania u suk z ropomaciczem oraz suk w ciąży wynosił, odpowiednio, 8,1 i 4,7% i nie różnił się znacząco od analogicznych wartości notowanych podczas różnych faz fizjologicznego cyklu rozrodczego. Proces wznowienia mejozy zachodził znacznie częściej w oocytach pobieranych od suk w fazie pęcherzykowej (3). Prawdopodobną przyczyną był fakt, że nabywanie zdolności mejotycznych jest kontrolowane przez wewnątrzkomórkową komunikację pomiędzy oocytom a otaczającymi go komórkami wzgórka jajonośnego. Podczas *anoestrus* komunikacja ta jest jednak zaburzona, co może wiązać się z trudnościami w nabywaniu kompetencji mejotycznych podczas hodowli *in vitro* oocytów pozyskiwanych w tej fazie cyklu rujowego (18).

Rycina 2 przedstawia oocyt suki pod mikroskopem stereoskopowym. Jest to oocyt wysokiej jakości (pierwszej kategorii) posiadający ciemną pigmentowaną ooplazmę i jest ściśle otoczony przez jedną lub wię-



Ryc. 1. Wpływ fazy cyklu rujowego na wznowienie podziałów mejotycznych po 48 godzinach dojrzewania oocytów w warunkach *in vitro* (24).



Ryc. 2. Obraz oocytu suki widoczny pod mikroskopem stereoskopowym (5)

cej warstw komórek wzgórka jajonośnego. Podobną liczbę oocytów najwyższej jakości uzyskiwano od suk we wszystkich fazach cyklu rujowego (9).

Wpływ wielkości oocyty oraz wieku dawczyni na dojrzewanie w warunkach *in vitro*

U wielu gatunków zwierząt oocyty osiągają zdolność do wznowienia procesu mejozy dopiero po osiągnięciu odpowiedniej wielkości (5, 10). Wyniki nielicznych badań sugerują, że wielkość oocyty koreluje z jego zdolnością do dojrzewania w warunkach *in vitro*. Najwyższy odsetek oocytów podlegających prawidłowemu procesowi dojrzewania *in vitro* stanowią oocyty duże o średnicy przekraczającej 100 μm (13). Tabela 1 ilustruje wpływ rozmiarów oocyty na jego dojrzewanie *in vitro* (20). Od rozmiarów oocytów zależy ich zdolność do przełamania fazy GV (GVBD – germinal vesicle break down) oraz osiągania przez nie stadium metafazy, anafazy I lub anafazy II po 48 godzinach hodowli. Wykazano, że proces dojrzewania oocytów w warunkach *in vitro* jest prawidłowy u 20% oocytów > 100 μm . Wśród oocytów o wymiarach < 100 μm prawidłowy przebieg procesu dojrzewania notuje się natomiast u 4% (20).

Wpływ wieku dawczyni na zdolność oocytów do dojrzewania jest zagadnieniem rzadko opisywanym i mało poznanym. Tabela 2 ukazuje wpływ wieku dawczyni na tempo osiągania przez oocyty stadium metafazy I, anafazy I oraz metafazy II. Oocyty pozyskiwane od suk starszych niż 7 lat zachowują wprawdzie zdolność dojrzewania w warunkach *in vitro*, jednak w porównaniu do samic młodszych jest ona znacznie mniejsza. Nie wykazano natomiast znaczącego wpływu wieku dawczyni na zdolność oocytów do przełamania fazy GV podczas inicjacji dojrzewania (13).

Wpływ dodatków do pożywek hodowlanych oraz zagęszczenia hodowli na dojrzewanie oocytów psa

Prowadzono liczne badania w celu określenia optymalnego składu pożywek do dojrzewania oocytów psa w warunkach *in vitro*. W przypadku pożywek opracowanych dla innych gatunków zwierząt dodatek gonadotropin poprawiał zdolność oocytów do dojrzewania (2, 8, 16, 19). W odniesieniu do psa informacje na ten temat nie są jednoznaczne. Uzupełnienie pożywki o gonadotropiny powodowało wzrost odsetka dojrzewających oocytów, lecz inne badania nie potwierdzają tych wyników (7, 11). Z nowszych badań wynika, że dodawanie do pożywki gonadotropin zatrzymywało podziały mejotyczne w późniejszych etapach dojrzewania oocytów (4, 26). Nie wyklucza się jednak, że obniżenie stężenia LH może być przyczyną zaburzeń w procesie dojrzewania oocytów (7).

Obecność w pożywce ludzkiej gonadotropiny kosmówkowej (hCG – human chorionic gonadotropin), hormonu niespecyficznego w środowisku hodowlanym spowodowała silny rozrost komórek wzgórka jajonośnego podczas 48 godzin dojrzewania. Najwyższy

Tab. 1. Wpływ wielkości oocyty na jego dojrzewanie *in vitro* (20)

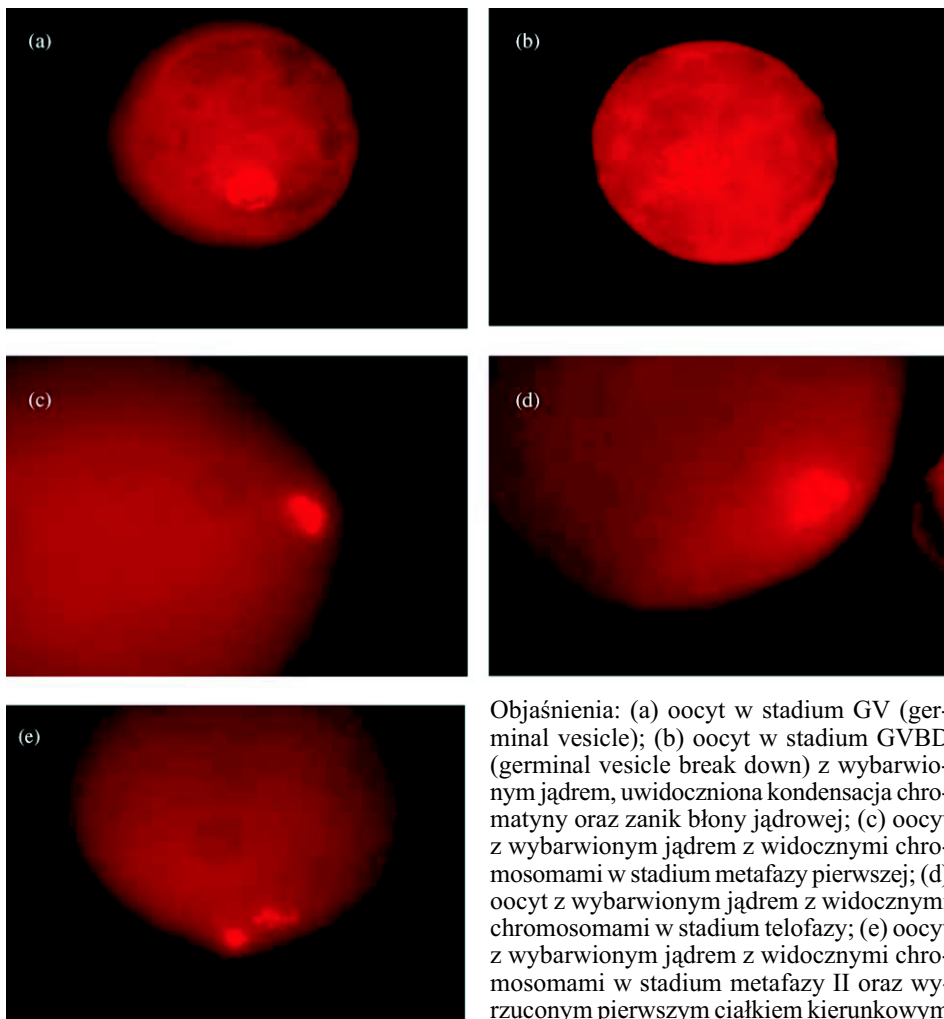
Wielkość oocyty (μm)	Odsetek oocytów w fazie GVBD po 48 i 96 godzinach hodowli	Odsetek oocytów w fazie MI, AI, MII po 48 godzinach hodowli
< 100	24	4
100	35	10
> 100	40	20

Tab. 2. Wpływ wieku dawczyni na tempo osiągania przez oocyty stadium metafazy I, anafazy I oraz metafazy II (20)

Wiek dawczyni (lata)	Odsetek oocytów w fazie GVBD po 48 i 96 godzinach hodowli	Odsetek oocytów w fazie MI, AI, MII po 48 godzinach hodowli
1-6	42	25
7 i więcej	30	4

odsetek oocytów, w których wzrastała liczba komórek wzgórka obserwowano po 72 godzinach hodowli (4). Rycina 3 przedstawia obraz oocytów psa barwionych jodkiem propidyny widoczny pod mikroskopem fluorescencyjnym. Niezależnie od dodatku hCG do pożywki hodowlanej najwięcej oocytów w fazie GV obserwowano po 24 godzinach hodowli (ryc. 3a). Podobnie wysoki odsetek oocytów (73,3%) notowano w fazie GVBD po 48 godzinach hodowli w pożywce bez dodatku hCG (ryc. 3b). Stadium metafazy I, telofazy I lub metafazy II najliczniej obserwowano po 72 i 96 godzinach hodowli (ryc. 3c, 3d, 3e). Odsetek oocytów w tych fazach cyklu komórkowego był znacznie wyższy w pożywkach z dodatkiem hCG. Po 96 godzinach inkubacji w środowisku z dodatkiem hCG, 31,7% oocytów znajdowało się w stadium metafazy II, natomiast w hodowli prowadzonej bez dodatku hCG odsetek ten był mniejszy i wyniósł 23,3%. Pod wpływem działania hCG oocyty wznawiały podział mejotyczny wcześniej, obserwowano również jego sprawniejszy i szybszy przebieg (4). Dodatek hCG wpływa korzystnie na proces dojrzewania oocytów poprzez katalizowanie procesu glikolizy oraz mitochondrialną oksydację glukozy w komórkach wzgórka jajonośnego, a tym samym zwiększenie ilości energii niezbędnej do procesu dojrzewania (4, 30).

U większości gatunków ssaków estrogeny są hormonami dominującymi w środowisku pęcherzyka przedowulacyjnego. Wzrost stężenia estradiolu we krwi jest niezbędny do przełamania ujemnego sprzężenia zwrotnego blokującego sekrecję hormonu luteinizującego (LH – luteinizing hormone). Przedowulacyjny wyrzut LH jest sygnałem do wznowienia podziałów mejotycznych oraz owulacji, która następuje w 24 do 72 godzin po gwałtownym wzroście stężenia tego hormonu we krwi (15). Bezpośrednio po owulacji oocyt poddawany jest działaniu podwyższonego poziomu estrogenów w jajowodzie. Estrogeny odgrywają ważną rolę w procesie wznowienia podziałów mejotycznych oraz w rozwoju oocytów do stadium



Objaśnienia: (a) oocyt w stadium GV (germinal vesicle); (b) oocyt w stadium GVBD (germinal vesicle break down) z wybarwionym jądrem, uwidoczniła kondensacja chromatyny oraz zanik błony jądrowej; (c) oocyt z wybarwionym jądrem z widocznymi chromosomami w stadium metafazy pierwszej; (d) oocyt z wybarwionym jądrem z widocznymi chromosomami w stadium telofazy; (e) oocyt z wybarwionym jądrem z widocznymi chromosomami w stadium metafazy II oraz wyrzuconym pierwszym ciałkiem kierunkowym

Ryc. 3. Obraz oocytów psa barwionych jodkiem propidyny widoczny pod mikroskopem fluorescencyjnym (5)

metafazy II. W przypadku, gdy oocyty pozyskiwane były od suk znajdujących się w fazie pęcherzykowej cyklu rujowego, dodatek estrogenów do pożywki w ilości 2,0 $\mu\text{l/ml}$ powodował wzrost odsetka dojrzewających oocytów z 2,9% w grupie kontrolnej do 14,7% w grupie doświadczalnej. Dodatek estradiolu powodował natomiast zmniejszenie odsetka oocytów znajdujących się w fazie GV z 14,2% w grupie kontrolnej do 4,0% w grupie doświadczalnej (15). W innych badaniach oceniano rozwój oocytów w pożywkach wzbogacanych o 20, 200, 2000, 4000, 8000 ng/ml^{-1} progesteronu. Niskie dawki hormonu powodowały obniżenie odsetka oocytów zdegenerowanych z 34,2% w grupie kontrolnej do 27,0% w grupie doświadczalnej (15). Dodatek progesteronu powodował równoczesne, lecz nieznaczne zmniejszenie odsetka oocytów przełamujących fazę GV i kontynuujących podział do stadium metafazy II (28).

Po wzbogaceniu pożywki hodowlanej dodatkiem estradiolu i progesteronu (odpowiednio o 2 i 0,5 $\mu\text{g/ml}$) odsetek dojrzewających oocytów zmniejszył się z 10,4% do 3,4% w porównaniu do oocytów dojrzewających w pożywkach zawierających wyłącznie dodatek estradiolu. Różny udział obu hormonów zapewniał także

wzrost odsetka oocytów przełamujących fazę GV (GVBD) z 65,4% do 79,2% (15).

W nielicznych badaniach hodowano oocyty w pożywce SOF (syntetyczny płyn jajowodowy, synthetic oviductal fluid) w celu określenia wpływu płynu jajowodowego na przebieg procesu dojrzewania oocytów psa *in vitro*. W jednym z eksperymentów zastosowano pożywkę SOF wzbogaconą o 0,3% oraz 4% dodatek surowicy bydłowej (BSA – bovine serum albumine). Odsetek oocytów dojrzewających do fazy GVBD po 48 godzinach hodowli wynosił: w grupie kontrolnej 27%, w grupie hodowanej w pożywce SOF z dodatkiem 0,3% BSA 45%, a w grupie hodowanej w pożywce SOF z dodatkiem 4% BSA 36%. Testowano również wpływ powyższych dodatków na dojrzewanie oocytów do stadium metafazy II. Odsetek oocytów kontynuujących rozwój do MII po 48 godzinach hodowli wynosił w grupie kontrolnej 6%, 5% w grupie oocytów hodowanych w pożywce SOF z dodatkiem 0,3% BSA oraz 7% w pożywce SOF z dodatkiem 4% BSA (12). Stwierdzono, że SOF nie miał istotnego wpływu

na zwiększenie odsetka oocytów w fazie GVBD. Stosowany w badaniach syntetyczny płyn jajowodowy opracowano w oparciu o skład płynu jajowodowego owcy. Różni się on jednak zasadniczo swoim składem od płynu w jajowodzie psa.

Współhodowla oocytów z komórkami nabłonkowymi jajowodu była próbą stworzenia warunków zbliżonych do fizjologicznego środowiska jajowodu psa. Do hodowli pierwszej grupy oocytów pożywkę TCM 199 uzupełniano o BSA, w drugiej grupie dodano BSA wzbogaconego o komórki jajowodowe, natomiast trzecią grupę oocytów hodowano z komórkami nabłonkowymi jajowodu. W pierwszej grupie 48% oocytów dojrzewało do fazy GVBD, a 1% do stadium metafazy II, w drugiej fazę GVBD osiągnęło 47%, a 4% osiągnęło stadium MII, natomiast w grupie oocytów hodowanych z komórkami nabłonkowymi jajowodu odsetek oocytów osiągających fazę GVBD wynosił 51%, a fazę mejozy II 1% (12). Wykazano, że współhodowla oocytów z komórkami nabłonkowymi jajowodu nie zwiększa odsetka oocytów osiągających fazę GVBD lub mejozy II.

Rola komórek wzgórków jajonośnego polega na utrzymaniu kompetencji jądra komórkowego i cytoplazmy

oocytów oraz stymulacji do wznowienia podziałów mejotycznych. Budowa morfologiczna kompleksów oocyt-wzgórek jajonośny (COC – cumulus-oocyte complex) wydaje się mieć duży wpływ na proces dojrzewania oocytów w warunkach *in vitro*. Stadium mejozy II osiągają wyłącznie oocyty z co najmniej dwiema warstwami komórek wzgórka jajonośnego (21). W warunkach *in vitro* międzykomórkowa komunikacja oocytu z komórkami wzgórka jajonośnego jest zaburzona (14, 17). Zwiększenie liczby kompleksów wzgórek-oocyt w kroplach pożywki hodowlanej z 1 do 10 – miało istotny wpływ na zmniejszenie odsetka oocytów, których rozwój zatrzymał się w metafazie I cyklu komórkowego. Odsetek oocytów, których podziały komórkowe zostały zatrzymane w fazie GV był niższy w grupie oocytów pozyskiwanych od suk w fazie *dioestrus*, w porównaniu do oocytów pobieranych od suk w fazie *anoestrus* (21). Zwiększenie odsetka oocytów psa dojrzewających do metafazy II procesu mejotycznego uzyskiwano także poprzez współhodowlę oocytów psa z bydlęcymi komórkami wzgórka jajonośnego (20). Substancje parakryne wydzielane przez komórki granulosa mogą pobudzać rozwój i wzrost oocytów oraz usuwać toksyny gromadzące się w pożywce podczas hodowli *in vitro* (22).

Przedstawiony przegląd piśmiennictwa dotyczący dotychczasowych badań i osiągnięć w zakresie możliwości wykorzystania technik *in vitro* w rozrodzie psów pozostawia wiele niewyjaśnionych pytań. Należy przypuszczać, że opracowanie efektywnych technik dojrzewania i zapłodnienia oocytów psa pozwoli na poznanie specyficznych aspektów rozrodu psowatych, takich jak: proces owulacji, dojrzewania, aktywacji oocytów oraz moment aktywacji genomu zarodka.

Piśmiennictwo

1. Albarracin J. L., Morato R., Izquierdo D., Mogas T.: Effects of roscovitine on the nuclear and cytoskeletal components of calf oocytes and their subsequent development. *Theriogenology* 2005, 64, 1740-1755.
2. Choi Y. H., Carnevale E. M., Seider E. G., Squire E. L.: Effects of gonadotrophins on bovine oocytes maturation in TCM-199. *Theriogenology* 2001, 56, 661-670.
3. De Avila Rodrigues B., Rodrigues J. L.: Influence of reproductive status on in vitro oocyte maturation in dogs. *Theriogenology* 2003, 60, 59-66.
4. De los Reyes M., De Lange J., Miranda P., Palominos J., Barros C.: Effect of human chorionic gonadotrophin supplementation during different culture periods on in vitro maturation of canine oocytes. *Theriogenology* 2005, 64, 1-11.
5. Durinzi K. L., Saniga E. M., Lanzendorf S. E.: The relationship between size and maturation in vitro in the unstimulated human oocyte. *Fertil. Steril.* 1995, 63, 404-406.
6. England G. C. W., Verstegen J. P., Hewn D. A.: Pregnancy following in vitro fertilisation of canine oocytes. *Vet. Rec.* 2001, 148, 20-22.
7. Eppig J. J.: Oocyte control of ovarian follicular development and function in mammals. *Reproduction* 2001, 122, 829-838.
8. Eppig J. J., Schroeder A. C., O'Brien M. J.: Developmental capacity of mouse oocytes matured in vitro: effects of gonadotrophic stimulation, follicular origin and oocyte size. *J. Reprod. Fertil.* 1992, 95, 119-127.
9. Fujii M., Otoi T., Muramaki M., Tanaka M., Une S., Suzuki T.: The quality and maturation of bitch oocytes recovered from ovaries by the slicing method. *J. Vet. Med. Sci.* 1999, 62, 305-307.
10. Gilchrist R. B., Nayudu P. L., Nowshari M. A., Hodges J. K.: Meiotic competence of marmoset monkey oocytes is related to follicle size and oocyte-somatic cell association. *Biol. Reprod.* 1995, 52, 1234-1243.
11. Hewitt D. A., England G. C.: Influence of gonadotrophin supplementation on the in vitro maturation of bitch oocytes. *Vet. Rec.* 1999, 144, 237-239.
12. Hewitt D. A., England G. C.: Synthetic oviductal fluid and oviductal cells coculture for canine oocyte maturation in vitro. *Anim. Reprod. Sci.* 1999, 55, 63-75.
13. Hewitt D. A., England G. C.: The effect of oocyte size and bitch age upon oocyte nuclear maturation in vitro. *Theriogenology* 1997, 49, 957-966.
14. Kalab P., Srsen V., Farstad W., Krogenases A., Motlik J., Hafne A. L.: MAP kinase activation and RAF-1 synthesis in blue fox oocytes is controlled by cumulus granulosa cells. *Theriogenology* 1997, 47, 400 (abstract).
15. Kim M. K., Fibrianto Y. H., Oh H. J., Jang G., Kim H. J., Lee K. S., Kang K. S., Lee B. C., Hwang W. S.: Effect of estradiol-17 β and progesterone supplementation on in vitro nuclear maturation of canine oocytes. *Theriogenology* 2005, 63, 1342-1353.
16. Kito S., Bavister B. D.: Male pronuclear formation and early embryonic development of hamster oocytes matured in vitro with gonadotrophins, amino acids and cysteamine. *J. Reprod. Fertil.* 1997, 110, 35-46.
17. Luvoni G. C.: Current progress on assisted reproduction in dog and cats: in vitro embryo production. *Reprod. Nutr. Dev.* 2000, 40, 505-512.
18. Luvoni G. C., Luciano A. M., Modina S., Gandolfi F.: Influence of different stages of estrus cycle of cumulus-oocyte communication in canine oocyte: effects on the efficiency of in vitro maturation. *J. Reprod. Fertil. Suppl.* 2001, 57, 141-146.
19. Mattioli M., Bacci M. L., Galeati G., Seren E.: Effect of LH and FSH on the maturation of pig oocytes in vitro. *Theriogenology* 1999, 36, 95-105.
20. Otoi T., Murakami M., Fujii M., Tanaka M., Ooka A., Une S., Suzuki T.: Development of canine oocytes matured and fertilised in vitro. *Vet. Rec.* 2000, 146, 52-53.
21. Otoi T., Willingham L., Shin T., Kraemer D. C., Westhusin M.: Effects of oocyte culture density on meiotic competence of canine oocytes. *Reproduction* 2002, 124, 775-781.
22. Parrott J. A., Skinner M. K.: Kit-ligand/stem cell factor induces primordial follicle development and initiates folliculogenesis. *Endocrinology* 1999, 140, 4262-4271.
23. Rodrigues B. A., Dos Santos L. C., Rodrigues J. L.: Embryonic development of in vitro matured and in vitro fertilized dog oocytes. *Mol. Reprod. Dev.* 2004, 67, 215-223.
24. Saint-Dizier M., Renard J. P., Chastant-Maillard S.: Induction of final maturation by sperm penetration in canine oocytes. *Reproduction* 2001, 121, 97-105.
25. Schoevers E. J., Kidson A., Verheijden J. H. M., Bevers M. M.: Effect of follicle-stimulating hormone on nuclear cytoplasmic maturation of sow oocytes in vitro. *Theriogenology* 2003, 59, 2017-2028.
26. Srsen V., Kalous J., Nagyova E., Sutovsky P., King W. A., Motlik J.: Effects of follicular stimulating hormone, bovine somatotrophin and okadaic acid on cumulus expansion and nuclear maturation of blue fox (*Alopex lagopus*) oocyte in vitro. *Zygote* 1998, 6, 299-309.
27. Tajik P., Shams Esfandabadi N.: In vitro maturation of caprine oocytes in different culture media. *Small Ruminant Res.* 2003, 47, 155-158.
28. Willingham-Rocky L. A., Hinrichs K., Westhusin M. E., Kraemer D. C.: Effects of stage of oestrous cycle and progesterone supplementation during culture on maturation of canine oocytes in vitro. *Reproduction* 2003, 126, 501-508.
29. Yamada S., Shimazu Y., Kawano Y., Nakazawa M., Naito K., Toyada Y.: Maturation, fertilization and development of oocytes in vitro. *Biol. Reprod.* 1992, 46, 853-858.
30. Zuelke K. A., Brackett B. G.: Luteinizing hormone enhanced in vitro maturation of bovine oocytes with or without protein supplementation. *Biol. Reprod.* 1990, 43, 784-787.

Adres autora: mgr inż. Renata Włodarczyk, ul. Sieradzka 16/4, 60-163 Poznań; e-mail: renia.wlodarczyk@poczta.onet.pl