

# Uzyskiwanie zarodków zwierząt gospodarskich *in vitro*\*)

ANNA M. DUSZEWSKA, ZYGMUNT REKLEWSKI\*

Zakład Embriologii Doświadczalnej, \*Zakład Doskonalenia Zwierząt IGiHZ PAN w Jastrzębcu, ul. Postępu 1, 05-552 Wólka Kosowska

Duszevska A. M., Reklewski Z.

## Obtaining *in vitro* embryos from farm animals

### Summary

The article presents the present state of knowledge about obtaining *in vitro* embryos from farm animals. This biotechnology includes: *in vitro* maturation of oocytes, *in vitro* fertilizing matured oocytes and *in vitro* culture of embryos. The aim of *in vitro* production of embryos is to obtain more blastocysts and blastocysts of good quality which will determine the efficiency of embryo transfer and facilitate the production of a greater number of healthy offspring. Offspring were produced after transferring embryos produced *in vitro* in sheep, cattle, pigs, goats and horses. This biotechnology is used in farm animal breeding, biotechnology and basic research.

**Keywords:** maturation, fertilization, farm animals

Uzyskiwanie zarodków zwierząt gospodarskich *in vitro* jest wieloetapową biotechniką. W pierwszym etapie zwanym dojrzewaniem oocytów, komórki te pobierane są od dawczyń przyżyciowo albo poubojowo. Proces dojrzewania oocyty przechodzą w warunkach *in vitro*. W kolejnym etapie zwanym zapłodnieniem *in vitro*, dojrzałe oocyty inkubowane są z plemnikami. Trzecim etapem jest hodowla zarodków *in vitro*. Powstałe w wyniku zapłodnienia zygoty najczęściej hodowane są do stadium blastocysty. W tym stadium zarodki mogą być przeniesione do biorecipientów lub też mogą być zamrożone albo wityfikowane i wykorzystane w późniejszym okresie. Do kluczowych elementów uzyskiwania zarodków zwierząt gospodarskich *in vitro* należy zaliczyć: pożywki do dojrzewania oocytów, zapłodnienia i hodowli zarodków (w skład których wchodzi: woda, aminokwasy, witaminy, hormony, czynniki wzrostowe, dodatek białka, i inne), warunki podczas dojrzewania, zapłodnienia i hodowli (temperatura, poziom CO<sub>2</sub>, wilgotność) oraz czas dojrzewania, zapłodnienia i hodowli. Wszystkie te wymagania są charakterystyczne dla poszczególnych gatunków zwierząt gospodarskich i zostały one szczegółowo opisane w opracowaniach z tego zakresu: bydło (13), świnie (1), owce i kozy (4) i konie (26).

Celem procedury uzyskiwania zarodków *in vitro* jest otrzymanie dużej liczby i dobrej jakości blastocyst. Liczba uzyskiwanych blastocyst jest uzależniona od liczby pobranych oocytów i warunków podczas ich

dojrzewania. Natomiast jakość blastocyst jest uzależniona od warunków podczas ich hodowli. Zarówno jakość, jak i liczba blastocyst decyduje o wynikach przeniesienia tych zarodków do biorecipientów, a tym samym o liczbie potomstwa i jego zdrowotności (23, 28).

Potomstwo po przeniesieniu do biorecipientów uzyskanych *in vitro* otrzymano u wszystkich gatunków zwierząt gospodarskich: owce – 1987 (11), bydło – 1988 (17), świnie – 1989 (18), kozy 1993 (5). U koni zarówno dojrzewanie, jak i zapłodnienie *in vitro* przez lata nastęrczało wiele problemów. Dopiero w 2002 r. otrzymano dwa źrebięta, z tym że oocyty dojrzewały w warunkach naturalnych, natomiast zapłodnienie i hodowlę zarodków przeprowadzono w warunkach *in vitro*. Obecnie u tego gatunku stosowane jest wprowadzenie plemnika do cytoplazmy dojrzałego *in vitro* oocytu – ICSI (Intracytoplasmic Sperm Injection), a następnie hodowlę zarodków *in vitro* i przeniesienie ich do biorecipientów (26).

Uzyskiwanie zarodków zwierząt gospodarskich *in vitro* ma zastosowanie w hodowli, biotechnologii, medycynie oraz w badaniach podstawowych. W hodowli zwierząt uzyskiwanie zarodków *in vitro* może być biotechniką alternatywną do inseminacji czy też programu MOET (Multiple Ovulation and Embryo Transfer) polegającego na wywoływaniu mnogich owulacji i przenoszeniu zarodków do biorecipientów. Istnieje możliwość wykorzystania samic tylko jako dawczyń oocytów bez obciążania ich dalszymi etapami tego programu. Dawczyniami oocytów mogą być również samice niedojrzałe do rozrodu i ciężarne (7, 8). W ostat-

\*) Publikacja wykonana w ramach grantu KBN 2PO6D05228.

nich latach coraz więcej uwagi poświęca się wykorzystaniu tej biotechniki w celu leczenia niepłodności u zwierząt gospodarskich. Oocyty oraz zarodki mogą być zamrażane lub witrifikowane, co pozwala na tworzenie ich banku. Zarodki uzyskane *in vitro* mają największe zastosowanie w biotechnologii, ponieważ jest to biotechnika umożliwiająca klonowanie zarodkowe i somatyczne, tworzenie osobników transgenicznych, klonowanie osobników transgenicznych, uzyskiwanie osobników jako dawców narządów do ksenotransplantacji czy też tworzenia chimer (22). Ogromne nadzieje w medycynie ludzkiej wiąże się z wykorzystaniem świń jako dawców narządów do ksenotransplantacji (25). Z pewnością ważnym kierunkiem, wykorzystującym uzyskiwanie zarodków *in vitro* są badania podstawowe, zarówno z zakresu dojrzewania oocytów, zapłodnienia oocytów, jak i wczesnego rozwoju zarodków. Wczesny rozwój zarodków bydłych jest zbliżony do wczesnego rozwoju zarodków ludzkich, stąd też bydło uważane jest za gatunek modelowy (19).

### Dojrzewanie oocytów *in vitro*

Oocyty pobierane są z pęcherzyków znajdujących się w warstwie korowej jajnika. Między gatunkami zwierząt gospodarskich istnieją różnice w układzie warstw jajnika. U krowy, owcy, kozy oraz świni warstwa korowa jest warstwą zewnętrzną, natomiast u klaczy ta warstwa znajduje się wewnątrz jajnika, co następcza problemy z pobieraniem oocytów. Oocyty można uzyskiwać przyżyciowo albo poubojowo (1, 4, 7, 8, 14, 16, 24, 26). Z metod przyżyciowych stosowana jest laparotomia (wszystkie gatunki), laparoscopia (owce, kozy i świni, jak też krowy i klacze) i OPU (Ovum Pick-Up), czyli pobieranie oocytów przez nakłucie pęcherzyków jajnikowych (krowy i klacze). Dość powszechnie u owiec i kóz stosowana jest laparoscopia w połączeniu z OPU (2). Z metod poubojowych najczęściej wykonywane jest nakłucie pęcherzyka jajnikowego za pomocą igły podłączonej do pompy ssącej (wszystkie gatunki), skrawanie jajników (przeważnie u klaczy) lub izolacja pęcherzyków jajnikowych, a następnie pobranie z nich oocytów (wszystkie gatunki) (1, 4, 16, 26).

Niedojrzałe oocyty otoczone są ściśle przylegającymi kilkoma warstwami komórek ziarnistych, zwanymi wieńcem promienistym oraz pasmem komórek należących do wzgórka jajonośnego, co wspólnie tworzy kompleks wzgórek jajonośny–oocyt. U klaczy oocyty mogą być otoczone zarówno ściśle przylegającymi, jak i rozproszonymi warstwami komórek wieńca promienistego (1, 4, 10, 26).

Niedojrzałe oocyty znajdują się w profazie I podziału mejotycznego, a dokładnie w fazie pęcherzyka zarodkowego. Dojrzewanie oocytów obejmuje przemiany jądrowe i cytoplazmatyczne, które zachodzą równocześnie. Wznowienie mejozy w warunkach *in vitro* jest spontaniczne u większości ssaków i rozpoczyna się

od rozpadu pęcherzyka zarodkowego, a kończy osiągnięciem przez oocyt metafazy II podziału mejotycznego, czyli stadium, w którym może wnikać do niego plemnik. Dojrzewanie cytoplazmatyczne obejmuje szereg zmian morfologicznych (modyfikacje w organelach i migracje niektórych z nich, wzrost liczby niektórych organelli, np. mitochondriów, tworzenie cytoszkieletu i wrzeciona podziałowego, i inne) oraz biochemicznych (regulację cyklu komórkowego, procesy metaboliczne, zmagazynowanie materiału zapasowego oraz materiału informacyjnego). W procesie dojrzewania oocytu ważną rolę pełnią komórki ziarniste wieńca promienistego, które odpowiadają za kontakt oocytu ze środowiskiem i tym samym pośredniczą w regulacji hormonalnej oraz metabolicznej procesu dojrzewania (1, 4, 10, 26).

Dojrzały oocyt charakteryzuje się rozproszeniem komórek wzgórka jajonośnego oraz równomiernie rozłożoną cytoplazmą, bez żadnych oznak degeneracji, fragmentacji i wakuolizacji. U niektórych gatunków można zaobserwować ciało kierunkowe (krowa, owca). Jednak u większości zwierząt gospodarskich pierwsze ciało kierunkowe nie jest widoczne ze względu na dużą ilość lipidów w cytoplazmie (świnie, klacz), toteż stopień dojrzałości określa się w sposób pośredni, tj. na podstawie rozproszenia komórek ziarnistych wzgórka jajonośnego (1, 4, 10, 26).

Między gatunkami występują różnice w tempie dojrzewania oocytów w warunkach *in vitro*. U krowy, owcy i kozy, oocyty osiągają dojrzałość, czyli stadium metafazy II po 24-godzinnej hodowli, natomiast u klaczy między 24. a 30. godziną hodowli. Najdłużej dojrzewają oocyty świni, gdyż stadium metafazy II osiągają między 40. a 48. godziną hodowli (1, 4, 10, 26).

### Zapłodnienie oocytów *in vitro*

Kolejnym etapem jest zapłodnienie dojrzałych oocytów. Najczęściej do zapłodnienia wykorzystywane są plemniki po rozmrożeniu. Jednak u świń i koni występują problemy z ich mrożeniem, dlatego u tych gatunków wykorzystywane są plemniki świeże, które poddawane są kapacytacji. Proces zapłodnienia obejmuje reakcję akrosomową skapacytowanych plemników. Następuje zespolenie gamet i aktywacja oocytu, a następnie dokończenie mejozy, czego wynikiem jest wyrzucenie II ciała kierunkowego, utworzenie przedjądźrzy, replikacje DNA, rozpoczęcie mitozy i ułożenie chromosomów we wspólną płytkę metafazalną. Różnice między gatunkami mogą dotyczyć asynchronii w tworzeniu przedjądźrzy oraz momentu rozpoczęcia replikacji (1, 4, 10, 26). U świń i koni, zarówno *in vivo*, jak i *in vitro* obserwowana jest wysoka częstotliwość polispermii, czyli wnikięcia do oocytu więcej niż jednego plemnika. Polispermia prowadzi do powstawania zarodków poliploidalnych. Zarodki triploidalne, jakkolwiek mogą się rozwijać do stadium blastocysty, jednak w późniejszym okresie w większości przypadków ulegają resorpcji. Z powodu dużej ilości

lipidów w cytoplazmie nie ma możliwości selekcji takich zarodków. U świń udało się przezwyciężyć polispermie, natomiast u koni ominięto ten problem stosując metodę ICSI (12).

U gatunków zwierząt gospodarskich tempo zapłodnienia jest zbliżone i wynosi od 18 do 20 godzin od momentu inseminacji. Różnice mogą wynikać z wprowadzenia plemnika do oocytu (ICSI), co prowadzi do wcześniejszego tworzenia zygoty (1, 4, 10, 26).

### Hodowla zarodków *in vitro*

Ostatnim etapem jest hodowla zarodków *in vitro*, czyli ich rozwój od stadium zygoty do moruli i blastocysty. Rozwój obejmuje: przemiany jądrowe i cytoplazmatyczne oraz ich wzajemne interakcje, metabolizm zarodka, przejęcie kontroli przez genom zarodkowy, ekspresję genów, tworzenie moruli oraz kompaktacją blastomerów, tworzenie blastocysty z charakterystyczną strukturą zwaną jamą blastocysty, powstałą w procesie kawitacji, czy też tworzenie dodatkowych struktur w zarodkach np. kapsuły w zarodkach koni (1, 4, 7, 20). Kapsuła jest to twór umieszczony między trofoblastem a osłonką przejrzystą, będący wytworem zarodka. Pełni ona rolę ochronną i występuje zarówno w zarodkach *in vivo*, jak i *in vitro* przez 2-3 tygodnie rozwoju (27).

Jednym z najważniejszych procesów mających miejsce podczas rozwoju zarodków i to zarówno *in vivo*, jak też *in vitro* jest przejęcie kontroli przez genom zarodkowy, co ma miejsce w stadium 4 blastomerów u świni oraz 8 lub 16 blastomerów u bydła, owce, kóz, koni. Do momentu uruchomienia genomu rozwój odbywa się w oparciu o materiał zgromadzony podczas dojrzewania oocytów.

Między gatunkami występują różnice w morfologii blastocyst uzyskanych *in vitro* i dotyczą ich wielkości oraz liczby blastomerów wchodzących w skład węzła zarodkowego i trofoblastu (1, 4, 10, 26). Na szczególną uwagę zasługuje różnica w liczbie blastomerów w zarodkach koni między blastocystami uzyskanymi *in vivo* (1761 blastomerów) a *in vitro* (255 blastomerów). U pozostałych gatunków obserwowane różnice nie są już tak duże (21).

Tempo rozwoju zarodków do stadium blastocysty jest charakterystyczne dla danego gatunku i jest związane z długością kolejnych cykli komórkowych oraz ich liczbą. Najkrócej, tj. 144 godziny, do stadium blastocysty rozwijają się zarodki świni, natomiast blastocysty bydłowe oraz owcze i kozie powstają po 168 godzinach. Najdłużej do stadium blastocysty rozwijają się zarodki końskie (od 168 do 192 godzin hodowli) (1, 4, 10, 26).

### Przeniesienie zarodków uzyskanych *in vitro* do biorczyń

Po przeniesieniu do biorczyń zarodków zwierząt gospodarskich uzyskanych *in vitro* odsetek potomstwa jest niższy niż zarodków *in vivo* (1, 4, 9, 10, 26). Od-

setek ocieleń, wykocień, wyźrebien wynosi odpowiednio 40-45%, 30%, 20% po przeniesieniu zarodków *in vitro* wobec 70%, 70-75%, 75% po przeniesieniu zarodków *in vivo*. Najniższy odsetek potomstwa stwierdzono u świń i wynosi tylko 5% oproszeń w porównaniu z 60% po przeniesieniu zarodków uzyskanych w sposób naturalny (21).

Zarodki uzyskane *in vitro* mogą być zamrożone lub wityfikowane i przeniesione do biorczyń w późniejszym okresie. Jednak ich zdolności rozwojowe po przeniesieniu do biorczyń są znacznie niższe niż zarodków *in vitro* nie mrożonych. U większości zwierząt gospodarskich potomstwo otrzymuje się po przeniesieniu do biorczyń zarodków zamrożonych w stadium wczesnej blastocysty i blastocysty. Natomiast o wiele mniej potomstwa uzyskuje się po przeniesieniu zarodków zamrożonych *in vitro* w stadium moruli. Dużo nadziei wiąże się z wityfikacją zarodków, po przeniesieniu których otrzymuje się o wiele więcej potomstwa (6).

### Zdolności rozwojowe zarodków uzyskanych *in vitro*

Zdolności rozwojowe zarodków uzyskanych *in vitro* są niższe w porównaniu z zarodkami *in vivo* i jest to wynikiem niedoskonałych warunków podczas dojrzewania oocytów, a następnie ich zapłodnienia oraz rozwoju zarodków (1, 4, 10, 26).

U wszystkich gatunków zwierząt gospodarskich występuje wysoka śmiertelność we wczesnym rozwoju zarodków *in vitro*. Wśród rodzajów śmierci pojedynczych, a czasami wszystkich blastomerów zarodka, najczęściej wyróżnia się martwicę oraz starzenie. O wiele rzadziej występuje zaprogramowana śmierć komórek, która obserwowana jest przede wszystkim w zarodkach koni. Ostatnio zwraca się uwagę na inne rodzaje śmierci komórek, a mianowicie na autofagię oraz na tzw. katastrofę mitotyczną. Nie należy wykluczać i innych, nieznanych dotąd typów śmierci zarodków (3, 20).

Nie zawsze dochodzi do śmierci zarodka, czasami jedynie do zaburzeń w jego rozwoju, które mogą ujawnić się znacznie później, czyli po implantacji albo podczas rozwoju postnatalnego osobnika. Do przyczyn tak wysokiej śmiertelności, jak też występowania zaburzeń można zaliczyć: zmieniony metabolizm podczas dojrzewania oocytów i rozwoju zarodków, nieprawidłowe włączenie się genomu zarodkowego oraz wadliwą ekspresję genów, zaburzenia chromosomowe (poliploidia, aneuploidia, miksploidia) (28). Interesującym zagadnieniem są modyfikacje epigenetyczne, czyli potranslacyjne zmiany w ekspresji genów, w tym genomowe naznaczenie zwane imprintingiem, do których może dochodzić w warunkach *in vitro* (29). Epigenetyczne modyfikacje podczas dojrzewania oraz rozwoju zarodków, a prawdopodobnie także w chwili zapłodnienia mogą wpływać na przedimplantacyjny, poimplantacyjny, a także postnatalny rozwój osobników. To może prowadzić do rozmaitych zaburzeń,

między innymi: wodogłowie, niedorozwoju lub uszkodzenia mózgu, nieprawidłowego rozwoju kończyn, powiększenia serca i wątroby, wystąpienia problemów z oddychaniem, jak również pojawienia się syndromu dużego potomstwa – Large Offspring Syndrom (LOS). Epigenetyczne modyfikacje mogą być przyczyną śmierci osobników w okresie pre- i postnatalnym (resorpcji, poronień czy też śmierci tuż po urodzeniu) (15).

Należy jednak podkreślić, że w większości przypadków potomstwo otrzymane po przeniesieniu zarodków uzyskanych *in vitro* nie różni się ani anatomicznie, ani fizjologicznie od potomstwa otrzymanego w warunkach naturalnych. Dlatego procedura uzyskiwania zarodków zwierząt gospodarskich *in vitro* stosowana jest obecnie na szeroką skalę i uważana za jedną z najważniejszych biotechnik w rozrodzie, bowiem łączy hodowlę zwierząt z biotechnologią i medycyną.

### Piśmiennictwo

1. *Abeydeera L. R.*: In vitro production of embryos in swine. *Theriogenology* 2002, 57, 257-273.
2. *Baldassarre H., Wang B., Kafidi N., Keefer C., Lazaris A., Karatzas C. N.*: Advances in the production and propagation of transgenic goats using laparoscopic ovum pick-up and in vitro embryo production technologies. *Theriogenology* 2002, 57, 275-284.
3. *Betts D. H., King W. A.*: Genetic regulation of embryo death and senescence. *Theriogenology* 2001, 55, 171-191.
4. *Cognie Y., Baril G., Poulin N., Mermillod P.*: Current status of embryo technologies in sheep and goat. *Theriogenology* 2003, 59, 171-188.
5. *Crozet N., Smedt V., Ahmed-Ali M., Sevellec C.*: Normal development following in vitro oocyte maturation and fertilization in the goat. *Theriogenology* 1993, 39, 206.
6. *Dobrinsky J. R.*: Advancements in cryopreservation of domestic animal embryos. *Theriogenology* 2002, 57, 285-3002.
7. *Duszeńska A. M., Reklewski Z.*: Izolacja oocytów od cielnych jałówek techniką OPU. *Medycyna Wet.* 2001, 57, 41-43.
8. *Duszeńska A. M., Reklewski Z., Wojdan J., Gawron W., Korwin-Kossakowski M., Cybulska M.*: Ocena jałówek jako dawczyń oocytów wykorzystywanych do uzyskania zarodków w warunkach *in vitro*. *Medycyna Wet.* 2003, 59, 58-60.
9. *Duszeńska A. M., Wojdan J., Gawron W., Lipiński D., Piliszek A., Went-Muchalska E., Waś B., Słomski R., Reklewski Z.*: Uzyskanie cieląt po transferze zarodków, do których wprowadzono konstrukcję genową. *Medycyna Wet.* 2004, 60, 1323-1325.
10. *Duszeńska A. M.*: Uzyskiwanie zarodków bydłych *in vitro* i ocena rozwoju zarodków z wprowadzoną konstrukcją genową. Rozprawa habilitacyjna. Prace i Materiały Zootechniczne. Monografie i rozprawy 2005, 13, 1-49.
11. *Gandolfi F., Moor R. M.*: Stimulation of early embryonic development in the sheep by co-culture with oviduct epithelial cells. *J. Reprod. Fertil.* 1987, 81, 23-28.
12. *Hinrichs K.*: Production of embryos by assisted reproduction in the horse. *Theriogenology* 1998, 49, 13-21.
13. *Hoshi H.*: In vitro production of bovine embryos and their application for embryo transfer. *Theriogenology* 2003, 59, 675-685.
14. *Jaśkowski J. M.*: Przyżyciowe pozyskiwanie komórek jajowych u krów – czynniki ryzyka. *Medycyna Wet.* 2001, 51, 792-795.
15. *Jaśkowski J. M., Traczykowski A.*: Syndrom dużego potomstwa. *Medycyna Wet.* 2002, 58, 247-250.
16. *Kątska L.*: Izolacja i hodowla *in vitro* bydłych pęcherzyków jajnikowych. *Medycyna Wet.* 1997, 53, 387-390.
17. *Lu K. H., Gordon I., Chen H. B., Gallagher M., McGovern H.*: Birth of twins after transfer of cattle embryos produced by *in vitro* techniques. *Vet. Rec.* 1988, 122, 539-540.
18. *Mattioli M., Bacci M. L., Galeati G., Seren E.*: Developmental competence of pig oocytes matured and fertilized *in vitro*. *Theriogenology* 1989, 31, 1201-1207.
19. *Niemann H., Wrenzycki C.*: Alterations of expression of developmentally important genes in preimplantation bovine embryos by *in vitro* culture conditions: implications for subsequent development. *Theriogenology* 2000, 53, 21-23.
20. *Okada H., Mak T. W.*: Pathways of apoptotic and non-apoptotic death in tumor cells. *Nature Cancer* 2004, 4, 592-603.
21. *Pomar F. J., Teerds K. J., Kidson A., Colenbrander B., Tharasanit T., Aguilar B., Roelen B. A. J.*: Differences in the incidence of apoptosis between *in vivo* and *in vitro* produced blastocysts of farm animal species: a comparative study. *Theriogenology* 2005, 63, 2254-2268.
22. *Raja F. P.*: Animal Biotechnology Dominant. New Delhi 2005, s. 272.
23. *Rizos D., Ward F., Duffy P., Boland M. P., Lonergan P.*: Consequences of bovine oocyte maturation, fertilization or early embryo development *in vitro* versus *in vivo*: Implication for blastocysts yield and blastocysts quality. *Mol. Reprod. Dev.* 2002, 61, 234-248.
24. *Smorąg Z., Gogol P., Kątska L., Jazdzewski J.*: Rozwój zarodków bydłych wyprodukowanych z oocytów uzyskanych metodą OPU. *Medycyna Wet.* 1999, 55, 317-320.
25. *Smorąg Z., Słomski R., Cierpka L.*: Biotechnologiczne i medyczne podstawy ksenotransplantacji. OWN, Poznań 2006, s. 388.
26. *Squires E. L., Carnevale E. M., McCue P. M., Bruemmer J. E.*: Embryo technologies in the horse. *Theriogenology* 2003, 59, 151-170.
27. *Tremoleda J. L., Stout T. A. E., Lagutina I., Lazzari G., Bevers M. M., Colenbrander B., Galli C.*: Effect of *in vitro* production on horse embryo morphology, cytoskeletal characteristics, and blastocyst capsule formation. *Biol. Reprod.* 2003, 69, 1895-1906.
28. *van Wagendonk-de Leeuw A. M., Mullaart E., de Roos A. P. W., Merton J. S., den Daas J. H. G., Kemp B., de Ruigh L.*: Effects of different reproduction techniques: AI, MOET or IVP on health and welfare of bovine offspring. *Theriogenology* 2000, 53, 575-597.
29. *Young L. E., Fairburn H. R.*: Improving the safety of embryo technologies: possible role of genomic imprinting. *Theriogenology* 2000, 53, 627-648.

Adres autora: doc. dr hab. Anna M. Duszeńska, Jastrzębiec, ul. Postępu 1, 05-552 Wólka Kosowska; e-mail: duszewskaanna@hotmail.com