

Efektywność aspiracji oraz jakość oocytów kozich uzyskiwanych laparoskopową metodą OPU

JAROSŁAW WIECZOREK, JURIJ KOSENJUK,
MIROŚLAW CEGŁA, LUCYNA KĄTSKA-KSIAŻKIEWICZ

Dział Biotechnologii Rozrodu Zwierząt Instytutu Zootechniki – Państwowego Instytutu Badawczego,
ul. Krakowska 1, 32-083 Balice

Wieczorek J., Kosenjuk J., Cegła M., Kątska-Książkiewicz L.

Efficacy of laparoscopic method OPU in goats

Summary

The aim of the study was to develop new techniques for the repeated recovery of goat and sheep oocytes useful for culture and fertilization *in vitro* and cloning and the evaluation of the efficacy of the established method. Oocytes were aspirated with a syringe or an originally designed catheter for aspiration. The oocytes donors were 54 goats. The animals were premedicated, after which general anesthesia was induced. The general anesthesia lasted about 22 min. The endoscope was inserted into the abdominal cavity. Two trockars for putting the manipulators were inserted 15 cm below the udder. Oocytes were collected by the aspiration of the follicular fluid from the ovarian follicles. Depending on the size, a single aspiration of up to 8 follicles was performed. The collected oocytes were evaluated under a stereoscopic microscope. The following rules of the evaluation and classification of the oocytes were established: class I – homogenous cytoplasm, at least 3 layers of the granulosa cells; class II – homogenous cytoplasm, 1-2 layers of granulosa cells; class III – homogenous cytoplasm, no granular cells; class IV – heterogenous cytoplasm, independent of the granulosa cells. Oocytes class I, II and III were qualified for the culture. 363 ovarian follicles were aspirated, 183 (50.41%) oocytes were obtained. 56 were qualified as class I, 79 – class II, 31 – class III, 8 – class IV. 175 (95.36%) of the obtained oocytes were qualified for the culture, including: 35.52% in class I, 43.17% – class II, 16.94% – class III. 4.37% of the collected oocytes were disqualified for the culture. The proposed technique allows for the collecting oocytes of good quality that can be used for IMV/IVF techniques and cloning.

Keywords: ovum pick-up, goat, laparoscopy, oocytes

Postęp w produkcji zarodków *in vitro* zwierząt gospodarskich uwarunkowany jest m.in. rozwojem metod uzyskiwania oocytów. Zastosowanie metod IVF/IVM (*in vitro* fertilization/*in vitro* maturation) w programach hodowlanych (MOET – multiple ovulation and embryo transfer), limitowane jest dostępnością do odpowiedniej liczby komórek jajowych zdolnych do dojrzewania i zapłodnienia *in vitro*. Dlatego też konieczne jest opracowanie skutecznych, przyżyciowych, powtarzalnych i mało inwazyjnych metod uzyskiwania oocytów, będących alternatywą dla metod chirurgicznych czy poubojowych. Metody niechirurgicznego uzyskiwania oocytów po raz pierwszy opisano u bydła. Była to tzw. transwaginalna metoda uzyskiwania oocytów pod kontrolą USG (OPU – ovum pick-up) (9, 22-24). Użycie laparoskopii i wideochirurgii pozwoliło na opracowanie metod OPU u średnich zwierząt gospodarskich owiec, kóz i świń (1, 5, 25). Ograniczeniem tych metod jest stosunkowo niska i zmieniająca się efektywność pozwalająca z aspirowanych pęche-

rzyków uzyskać od 50% do 80% oocytów, z których do dalszej hodowli kwalifikowane jest 30-90%. W efekcie uzyskuje się nie więcej niż 15% do 80% oocytów dobrej jakości. Na efektywność metod mają wpływ m.in.: odpowiedni dobór dawczyń, stymulacja hormonalna, częstotliwość uzyskiwania oocytów oraz czynniki techniczne np.: wielkość stosowanego podciśnienia, grubość igły, sposób aspiracji pęcherzyków, sposób stabilizacji jajnika i sprawność manualna operatorów (1, 2, 4).

Podjęte badania miały na celu poprawienie efektywności aspiracji i jakości uzyskiwanych oocytów kozich laparoskopową metodą OPU poprzez dopracowanie techniki penetracji powłok brzusznych, sposobu stabilizacji jajników i aspiracji pęcherzyków jajnikowych.

Materiał i metody

Dawczyniami oocytów były 54 kozy w wieku 1-3 lat, o masie ciała 35-50 kg. Dawczynię poddano synchroniza-

cji cyklu płciowego i superowulacji. Synchronizację cyklu płciowego przeprowadzono gąbkami dopochwowymi Chronogest (Cronolone 30 mg, Intervet GmbH) przez 11-14 dni. Superowulację indukowano przez jednorazowe podanie 1000 j.m. PMSG (Folltropin 1000 J.M., Intervet BV) na 16-24 godziny przed usunięciem gąbek. Oocyty pozyskiwano w 24 godziny po usunięciu gąbek.

Oocyty pozyskiwano w 12 sesjach, w grupach liczących jednorazowo 2-6 kóz.

Przed zabiegiem zwierzęta premedykowano przez podanie atropiny 0,05 mg/kg i.m. (Atropinum Sulfuricum 0,5 mg, Polfa Warszawa) i ksylazyny 3-5 mg/kg i.m. (Rometar 2%, Spofa Praha). Znieczulenie ogólne indukowano przez podanie thiopentalu sodu 5-10 mg/kg i.v. (Tiopental 1,0 g, Sandoz GmbH). Czas znieczulenia wynosił 15-30 minut.

Po ułożeniu zwierzęcia w pozycji grzbietowej do jamy brzusznej wprowadzono endoskop. Po wypełnieniu jamy brzusznej filtrowanym powietrzem atmosferycznym zakładano dwa trokary dla manipulatorów 15 cm dogłowo od wymienia. Trokary zakładano na planie trójkąta równoramiennego o długości ramion 15-20 cm. Do jamy brzusznej wprowadzono chwytkę do stabilizacji jajnika. Jajnik po izolacji z lejka jajowodu stabilizowano przez uchwycenie jego więzadła możliwie blisko końca. Przez drugi trokar wprowadzono kateter do aspiracji oocytów. Przyjęto dwa warianty założenia kamery endoskopu i kateteru do aspiracji oraz dwa sposoby aspiracji oocytów.

W pierwszym (grupa 1; n = 20) endoskop zakładano w linii środkowej, kateter do aspiracji lewostronnie, a oocyty aspirowano przy użyciu strzykawki do aspiracji. W wariacie drugim (grupa 2; n = 34) wprowadzono modyfikacje: kamerę edoskopu i kateter do aspiracji zamieniono miejscami, strzykawkę do aspiracji zastąpiono kateterem zakończonym strzykawką 10 ml. Oocyty aspirowano igłami o grubości 20G-22G. Oocyty pozyskiwano w kompleksach oocyt – wzgórek jajonośny (COCs – cumulus oocyte complexes), aspirując strzykawką płyn pęcherzykowy z pęcherzyków jajnikowych. Aspirowano wszystkie pęcherzyki widoczne na powierzchni jajnika o średnicy powyżej 3 mm (ryc. 1). W zależności od wielkości jednorazowo aspirowano od 2 do 8 pęcherzyków. Pozyskany płyn gromadzono w naczynkach z Medium 199 HEPES Modification (Sigma-Aldrich, No kat. M2520) z dodatkiem heparyny w ilości 5,0 IU/ml medium.

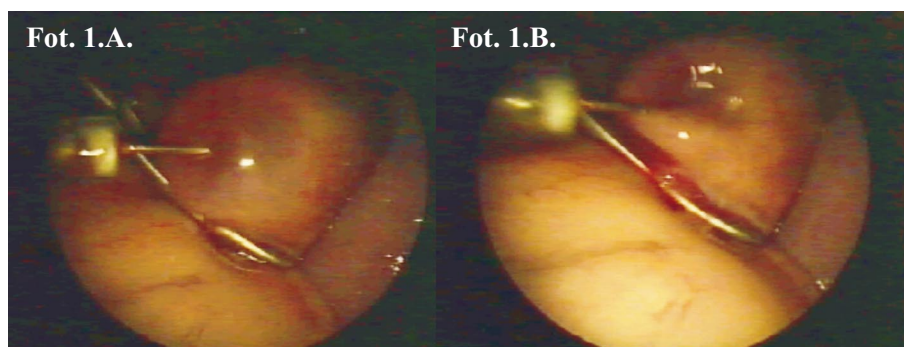
Po aspiracji pęcherzyków katetery usuwano w odwrotnej kolejności niż je zakładano. Na skórę zakładano pojedyncze szwy proste, otrzewnej i powłok brzusznych nie szyto. Po zabiegu zwierzęta obserwowano przez 7 dni. Środki przeciwbólowe stosowano jednorazowo bezpośrednio po zabiegu.

Pozyskane komórki jajowe przepłukiwano trzykrotnie w Medium 199 HEPES Modification (Sigma-Aldrich, no kat. M2520) z dodatkiem 500 IU heparyny w 100 ml medium i oceniano pod mikroskopem stereoskopowym (25-40 ×). Przyjęto następujące zasady oceny i kwalifikacji pozyskanych oocytów i kompleksów oocyt – komórki wzgórek jajonośnego: klasa I – oocyty o jednorodnej cytoplazmie, z minimum 3 warstwami komórek ziarnistych, klasa II o jednorodnej cytoplazmie, z 1 lub 2 warstwami komórek ziarnistych, klasa III – oocyty o jednorodnej cytoplazmie pozbawione komórek ziarnistych oraz klasa IV oocyty o niejednorodnej cytoplazmie bez względu na ilość komórek ziarnistych. Do hodowli kwalifikowano oocyty I, II i III klasy.

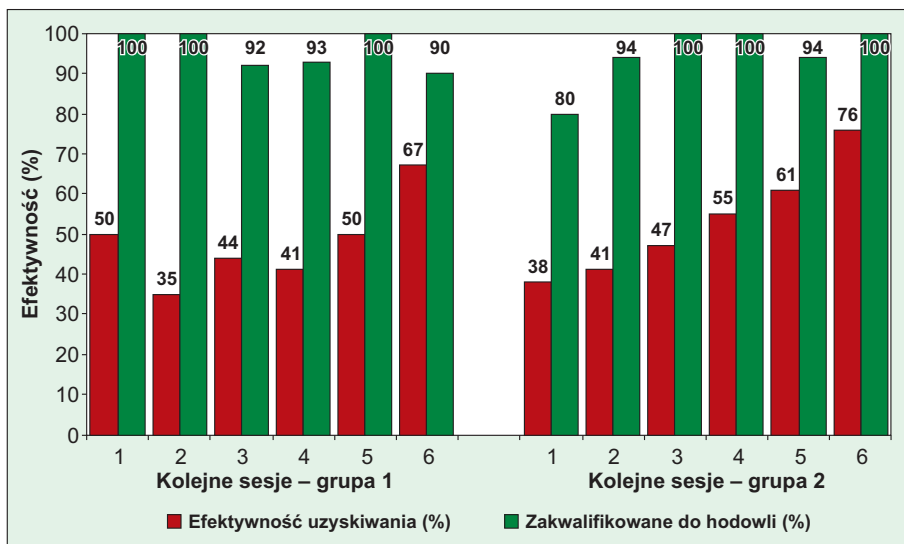
Uzyskane wyniki poddano analizie statystycznej testem t-Studenta.

Wyniki i omówienie

Pięćdziesiąt cztery kozy poddano synchronizacji cyklu płciowego i superowulacji, oocyty aspirowano od 43. Łącznie z 82 jajników aspirowano 363 pęcherzyki, z których pozyskano 183 oocyty. Średnia efektywność uzysku wynosiła 50,41%, wahając się w poszczególnych sesjach od 34,6% do 76,5% (ryc. 2). Ze 183 uzyskanych oocytów do hodowli i zapłodnienia *in vitro* zakwalifikowano 175 (95,63%), spośród nich



Ryc. 1. Uzyskiwanie oocytów – aspiracja płynu pęcherzykowego z pęcherzyków jajnikowych (Fot. 1 A i B)



Ryc. 2. Efektywność uzyskiwania oocytów w kolejnych sesjach

65 (35,52%) zakwalifikowano do klasy I, 79 (43,17%) do klasy II i 31 (16,94%) do klasy III. Pozostałe 8 oocytów (4,37%) zdyskwalifikowano jako nie nadające się do hodowli *in vitro* ze względu na brak komórek wzgórka jajonośnego i zmiany w cytoplazmie (tab. 1 i 2).

Średnio u jednej dawczyni aspirowano $6,77 \pm 4,82$ (0-25) pęcherzyków jajnikowych, uzyskano $5,8 \pm 4,42$ oocytów (0-19), do hodowli zakwalifikowano $3,2 \pm 3,0$, w tym $1,20 \pm 2,23$ w klasie I, $1,46 \pm 2,34$ w klasie II i $0,51 \pm 0,88$ w klasie III, zdyskwalifikowano $0,14 \pm 0,36$ oocytów.

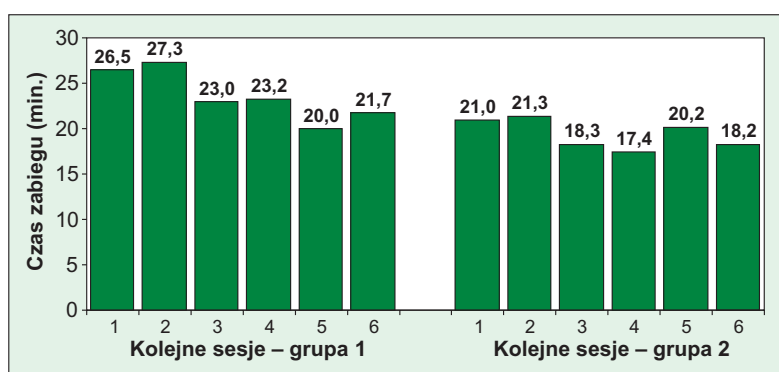
Na jednym jajniku aspirowano średnio $4,56 \pm 2,27$ pęcherzyków, uzyskano $2,23 \pm 1,52$ oocytów, do hodowli zakwalifikowano $2,13 \pm 1,52$, w tym $0,79 \pm 1,09$ w klasie I, $0,96 \pm 1,23$ w klasie II i $0,38 \pm 0,53$ w klasie III, nie zakwalifikowano $0,10 \pm 0,19$ oocytów.

Czas wykonania zabiegu w poszczególnych sesjach wahał się od 17,4 do 27,3 minut. Średni czas wykonania zabiegu wynosił 21,6 minut (23,6 min. w grupie 1 i 20,0 min. w grupie 2) (ryc. 3). Wykonany zabieg nie wpłynął na dobrostan dawczyń. W trakcie 7-dniowej obserwacji u żadnego ze zwierząt nie stwierdzono niepożądanych skutków po zabiegu.

Standardowe oprzyrządowanie zestawu do laparoskopowego pozyskiwania oocytów u kóz składa się ze sztywnego endoskopu z kamerą, chwytak do stabilizacji jajników i strzykawki lub kateteru do aspiracji oocytów. W ogólnie przyjętym modelu laparoskopowego OPU u średnich zwierząt gospodarskich zakłada się trzy lub cztery trokary o średnicy 5-8 mm. Kamera endoskopu wprowadzana jest przez pępek. Bocznie i doogonowo od endoskopu wprowadzane są chwytaki i kateter (1, 2, 10).

W proponowanej własnej metodzie przyjęto nowy, oryginalny sposób umiejscowienia trokarów. Zakładano je na planie trójkąta równoramiennego o długości ramion 15-20 cm i podstawie umieszczonej 10-15 cm dogłowowo od wymion. Kamerę endoskopu początkowo umieszczono w linii środkowej poniżej pępka, następnie zamieniono miejscem z lewym manipulatorem (strzykawką lub kateterem do

aspiracji oocytów). Przez prawy trokar wprowadzano chwytak do stabilizacji jajnika. Jajnik stabilizowano jedną chwytaką. Ze wstępnych badań przeprowadzonych w symulatorze na izolowanych narządach świń wynikało, że optymalne jest stabilizowanie jajnika pojedynczą chwytaką możliwie blisko końca krezki. Taki sposób stabilizacji jajnika daje bowiem możliwość swobodnej manipulacji w obrębie jamy brzusznej i łatwy dostęp do aspirowanych pęcherzyków. Wprawdzie stabilizacja dwoma chwytakami pozwala na pewniejszą stabilizację jajnika, stwarza jednak konieczność zakładania dodatkowego, czwartego trokara i uniemożliwia swobodną manipulację narzędziami w obrębie jamy brzusznej (26, 28). W ogólnym schemacie przyjęto, że optymalne jest zakładanie trzech trokarów w następującym układzie: lewy trokar – sztywny



Ryc. 3. Czas trwania zabiegu

Tab. 1. Efektywność laparoskopowej metody OPU u kóz

Grupa	Liczba		Oocyty zakwalifikowane do hodowli (klasy I-III)		
	aspirowanych pęcherzyków	uzyskanych oocytów ogółem (%)	Liczba	A (%)	B (%)
Grupa 1 (n = 20)	161	71 (44,10 ± 0,23)	67	94,37 ± 0,11	41,61 ± 0,23
Grupa 2 (n = 34)	202	112 (55,45 ± 0,27)	108	96,43 ± 0,29	53,47 ± 0,29
Łącznie	363	183 (50,41 ± 0,26)	175	95,36 ± 0,19	48,21 ± 0,27

Objaśnienia: A – w stosunku do liczby uzyskanych oocytów (%), B – w stosunku do liczby aspirowanych pęcherzyków (%)

Tab. 2. Klasyfikacja morfologiczna uzyskanych oocytów

Grupa	Klasa											
	I			II			III			IV		
	liczba	A (%)	B (%)	liczba	A (%)	B (%)	liczba	A (%)	B (%)	liczba	A (%)	B (%)
Grupa 1 (n = 20)	24	32,29 ± 0,38	14,29 ± 0,20	35	49,30 ± 0,40	21,74 ± 0,19	8	5,59 ± 0,13	12,68 ± 0,17	4	4,23 ± 0,09	1,86 ± 0,05
Grupa 2 (n = 34)	42	37,50 ± 0,37	20,79 ± 0,21	44	39,29 ± 0,38	21,78 ± 0,31	22	19,64 ± 0,35	10,89 ± 0,16	4	4,46 ± 0,24	2,48 ± 0,06
Łącznie	56	35,52 ± 0,37	17,91 ± 0,21	79	43,17 ± 0,40	21,76 ± 0,26	31	16,94 ± 0,29	8,54 ± 0,15	8	4,37 ± 0,19	2,20 ± 0,06

Objaśnienia: jak w tab. 1

endoskop z kamerą, pośrodkowy – strzykawka lub kateter do aspiracji oocytów, prawy trokar – chwytka do stabilizacji jajnika. Taki sposób założenia trokarów i manipulatorów pozwala na swobodny dostęp do jajnika i zapewnia możliwość pozyskania oocytów przy szerokim polu widzenia, obejmującym narządy wewnętrzne, chwytki i kateter.

Oocyty uzyskiwane są przez aspirację płynu pęcherzykowego z pęcherzyków jajnikowych. W dostępnej literaturze do aspiracji płynu pęcherzykowego stosowane są aparaty do pozyskiwania oocytów transwaginalną metodą OPU u bydła (1, 3, 8, 17). Dużą zaletą tych systemów jest możliwość kilkukrotnego przepłukiwania aspirowanego pęcherzyka, co zwiększa efektywność uzysku. Wykazano jednak, że na skutek wysokiego ciśnienia w trakcie aspiracji dochodzi do mechanicznego ogołocenia uzyskiwanych oocytów i znacznego obniżenia ich jakości (26, 28). Z tego względu w przeprowadzonych badaniach oocyty aspirowano specjalnie skonstruowaną oryginalną strzykawką do pozyskiwania oocytów (patent nr 31068) lub kateterem do aspiracji. Aspiracja strzykawką lub kateterem pozwoliły na zachowanie odpowiedniej morfologii uzyskiwanych oocytów. Z uzyskanych oocytów ponad 95% zakwalifikowano do hodowli, z tego aż ponad 78% stanowiły komórki jajowe zakwalifikowane do I i II klasy. Oocyty początkowo aspirowano strzykawką. Ze względu na niewielką objętość i konieczność częstej wymiany strzykawki w trakcie aspiracji, zastąpiono ją kateterem pozwalającym na ciągłą aspirację płynu pęcherzykowego. Modyfikacje te pozwoliły skrócić czas zabiegu o 3-5 minut oraz podnieść efektywność średnio o około 25%. Między grupami nie stwierdzono jednak różnic statystycznie istotnych.

O skuteczności metody decyduje liczba i jakość uzyskanych oocytów. Głównym kryterium jakości jest zachowanie prawidłowej morfologii pozyskanych komórek jajowych oraz zdolności do rozwoju i hodowli *in vitro*. Stosowane są różne kryteria oceny i klasyfikacji oocytów od 2- do 6-stopniowych (3, 10, 14-17, 19, 26). Najlepsze jakościowo są oocyty z jednorodną cytoplazmą, wieńcem promienistym i zwartą warstwą komórek wzgórka jajonośnego (COCs – cumulus oocyte complexes). Do hodowli kwalifikowane są też oocyty o nieco gorszej jakości z jednolitą cytoplazmą, wieńcem promienistym i luźną warstwą komórek wzgórka jajonośnego (expanded COCs). Są autorzy, którzy kwalifikują do hodowli także oocyty pozbawione komórek ziarnistych (DCOCs – cumulus-denuded oocytes) o prawidłowej cytoplazmie (15, 17, 19).

W badaniach zastosowano czterostopniową skalę oceny oocytów. Jako czynnik dyskwalifikujący przyjęto zmiany jakościowe w cytoplazmie, bez względu na liczbę komórek ziarnistych w kompleksie oocyt–komórki wzgórka jajonośnego. Podobną skalę oceny i klasyfikacji oocytów kozich zastosowali Koeman

i wsp. (17) i Locatelli i wsp. (19), uzyskując niższą efektywność. W niniejszych badaniach uzyskano średnio 50,41% aspirowanych oocytów.

U kóz średnio uzyskuje się od 56% do 88% aspirowanych oocytów, z których do hodowli kwalifikuje się od 28,5% do 95% (3, 4, 7, 8, 10, 17). W badaniach własnych w porównaniu z dostępnymi pracami innych autorów osiągnięto najwyższy procent oocytów zakwalifikowanych do hodowli. Dzięki zastosowaniu odpowiedniej grubości igieł 20G-22G, krótkich kateterów o długości do 40 cm i zmniejszeniu ciśnienia udało się ograniczyć uszkodzenia mechaniczne wieńca promienistego i warstwy komórek wzgórka jajonośnego, tym samym poprawić jakość pozyskiwanych oocytów (26, 28). Podobne rezultaty uzyskali Brussow i wsp. (5). Istnieje szereg czynników natury technicznej, mających wpływ na efektywność metody. Do czynników tych należą m.in.: wielkość stosowanego podciśnienia, grubość igły, wielkość aspirowanych pęcherzyków, sposób aspiracji pęcherzyków, sposób stabilizacji jajnika, odległość między pęcherzykiem a naczyniem zbiorczym. Do aspiracji pęcherzyków i uzyskiwania oocytów co najmniej dobrej jakości optymalne są: niskie ciśnienie rzędu 0,2-0,04 bar oraz średnie rozmiary igieł 20G-22G (26, 28). Ze wzrostem ciśnienia obniża się znacznie efektywność pozyskiwania i jakość oocytów, głównie wzrasta ilość oocytów ogołoconych (6). Aspiracja przy pomocy strzykawki nie pozwalała wprawdzie na kontrolę podciśnienia, jednak na podstawie uzyskanych wyników i danych z piśmiennictwa (6, 26, 28) można przyjąć, że podciśnienie oscyloowało w zalecanym przedziale 0,2-0,04 bar. Dodatkowo w przyjętym modelu badań stosowano czterostopniową skalę oceny, według której do hodowli brano także oocyty pozbawione komórek granulozy, które nie były kwalifikowane przez innych autorów stosujących ostrzejsze kryteria (3, 10, 14, 16, 26). W ostatnich latach zwraca się bowiem uwagę na możliwość hodowli oocytów pozbawionych komórek ziarnistych, jeśli hodowane są z dodatkiem komórek granulozy. Badania takie prowadzono u ludzi (12) i na szeregu gatunków zwierząt m.in.: myszach (21), krowach (11, 13) świniami (20), kozach (29) i owcach (18). Interesujące rezultaty uzyskali Miao i wsp. (21), wykazując możliwość dojrzewania oocytów myszy pozbawionych komórek ziarnistych, w hodowli z oocytami COCs w proporcji 1 : 2. Biorąc to pod uwagę uzasadnione było zastosowanie łagodniejszych kryteriów oceny uzyskanych oocytów.

Uzyskane wyniki wskazują, że zaproponowana technika laparoskopowego pozyskiwania oocytów pozwala na uzyskanie odpowiedniej liczby komórek jajowych zdolnych do hodowli *in vitro*, a zatem na ich wykorzystanie w programach IVM/IVF czy klonowaniu. Metoda umożliwia również przyżyciowe, szybkie i skuteczne wykonanie zabiegu przy minimalnej inwazyjności i zachowaniu doskonałej kondycji zwierząt.

Piśmiennictwo

1. Baldassarre H., de Matos D. G., Furnus C. C., Castro T. E., Cabrera Fischer E. I.: Technique for efficient recovery of sheep oocytes by laparoscopic folliculocentesis. *Anim. Reprod. Sci.* 1994, 359, 145-150.
2. Baldassarre H., Furnus C. C., de Matos D. G., Pessi H.: In vitro production of sheep embryos using laparoscopic folliculocentesis: alternative gonadotrophin treatments for stimulation of oocyte donors. *Theriogenology* 1996, 45, 707-717.
3. Baldassarre H., Wang B., Kafidi N., Gauthier M., Neveu N., Lapointe J., Sneek L., Leduc M., Duguay F., Zhou J. F., Lazaris A., Karatzas C. N.: Production of transgenic goats by pronuclear microinjection of in vitro produced zygotes derived from oocytes recovered by laparoscopy. *Theriogenology* 2003, 59, 831-839.
4. 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.
5. Brüssow K. P., Rátky J.: Repeated laparoscopic follicular and oocyte aspiration in swine. *Reprod. Dom. Anim.* 1994, 29, 494-502.
6. Brüssow K. P., Torner H., Ratky J., Hunter M. G., Nurnberg G.: Ovum pick up in swine: the influence of aspiration vacuum pressure on oocyte recovery from preovulatory follicles. *Acta Vet. Hung.* 1997, 45, 189-196.
7. Cognié Y., Baril G., Poulin N., Mermillod P.: Current status of embryo technologies in sheep and goat. *Theriogenology* 2003, 59, 171-188.
8. Cox J. F., Alfaro V.: In vitro fertilization and development of OPU derived goat and sheep oocytes. *Reprod. Domest. Anim.* 2007, 42, 83-87.
9. Duszewska A. M., Reklewski Z.: Izolacja oocytów od cielnych jałówek techniką OPU. *Medycyna Wet.* 2001, 57, 41-43.
10. Graff K. J., Meintjes M., Dyer V. W., Paul J. B., Denniston R. S., Ziomek C., Godke R. A.: Transvaginal ultrasound-guided oocyte retrieval following FSH stimulation of domestic goats. *Theriogenology* 1998, 51, 1099-1199.
11. Hussein T. S., Thompson J. G., Gilchrist R. B.: Oocyte-secreted factors enhance oocyte developmental competence. *Dev. Biol.* 2006, 296, 514-521.
12. Hwang J. L., Lin Y. H., Tsai Y. L.: In vitro maturation and fertilization of immature oocytes: a comparative study of fertilization techniques. *J. Assist. Reprod. Genet.* 2000, 7, 39-43.
13. Ikeda S., Saeki K., Imai H., Yamada M.: Abilities of cumulus and granulosa cells to enhance the developmental competence of bovine oocytes during in vitro maturation period are promoted by midkine; a possible implication of its apoptosis suppressing effects. *Reproduction* 2006, 132, 549-557.
14. Islam M. R., Khandoker M. A., Afroz S., Rahman M. G., Khan R. I.: Qualitative and quantitative analysis of goat ovaries, follicles and oocytes in view of in vitro production of embryos. *J. Zhejiang Univ. Sci. B* 2007, 8, 465-469.
15. Kątska L., Smorąg Z.: Number and quality of oocytes in relation to age of cattle. *Anim. Reprod. Sci.* 1984, 7, 451-460.
16. Kątska-Książkiewicz L., Opiela J., Ryńska B.: Effects of oocyte quality, semen donor and embryo co-culture system on the efficiency of blastocyst production in goats. *Theriogenology* 2007, 68, 736-744.
17. Koeman J., Keefer C. L., Baldassarre H., Downey B. R.: Developmental competence of prepubertal and adult goat oocytes cultured in semi-defined media following laparoscopic recovery. *Theriogenology* 2003, 60, 879-889.
18. Ledda S., Bogliolo L., Leoni G., Naitana S.: Cell coupling and maturation-promoting factor activity in in vitro-matured prepubertal and adult sheep oocytes. *Biol. Reprod.* 2001, 65, 247-252.
19. Locatelli Y., Vallet J. C., Huyghe F. P., Cognié Y., Legendre X., Mermillod P.: Laparoscopic ovum pick-up and in vitro production of sika deer embryos: effect of season and culture conditions. *Theriogenology* 2006, 66, 1334-1342.
20. Maedomari N., Kikuchi K., Ozawa M., Noguchi J., Kaneko H., Ohnuma K., Nakai M., Shino M., Nagai T., Kashiwazaki N.: Cytoplasmic glutathione regulated by cumulus cells during porcine oocyte maturation affects fertilization and embryonic development in vitro. *Theriogenology* 2007, 67, 983-993.
21. Miao Y. L., Liu X. Y., Qiao T. W., Miao D. Q., Luo M. J., Tan J. H.: Cumulus cells accelerate aging of mouse oocytes. *Biol. Reprod.* 2005, 73, 1025-1031.
22. Pieterse M. C., Kappen K. A., Kruip T. A., Tayerné M. A.: Aspiration of bovine oocytes during transvaginal ultrasound scanning of the ovaries. *Theriogenology* 1988, 30, 751-762.
23. Smorąg Z., Gogol P., Kątska L., Jażdżewski J.: Rozwój zarodków bydłych wyprodukowanych z oocytów metodą OPU. *Medycyna Wet.* 1999, 55, 317-320.
24. Smorąg Z., Gogol P., Kuznetsov V.: Transwaginalna metoda uzyskiwania oocytów bydłych: efektywność aspiracji, możliwości rozwojowe oocytów oraz zastosowanie w hodowli. *Biotechnologia* 1998, 2, 153-160.
25. Stangl M., Kuhholzer B., Besenfeldre U., Brem G.: Repeated endoscopic ovum pick-up in sheep. *Theriogenology* 1999, 52, 709-716.
26. Wang B., Baldassarre H., Tao T., Gauthier M., Neveu N., Zhou J. F., Leduc M., Duguay F., Bilodeau A. S., Lazaris A., Keefer C., Karatzas C. N.: Transgenic goats produced by DNA pronuclear microinjection of in vitro derived zygotes. *Mol. Reprod. Dev.* 2002, 63, 437-443.
27. Wieczorek J., Cegła M., Kareta W.: Factors affecting the oocyte recovery rate from ovarian follicles of gilts. *Ann. Anim. Sci.* 2005, 5, 85-89.
28. Wieczorek J., Kosenyuk Y., Kareta W., Cegła M.: Oocyte recovery rate with application of laparoscopic ovum pick-up in pigs. *Ann. Anim. Sci.* 2007, 7, 89-97.
29. Zhang X., Han Y. B., Sui H. S., Miao D. Q., Wang J. Z., Li K. L., Tan J. H.: Developmental and hormonal regulation of cumulus expansion and secretion of cumulus expansion-enabling factor (CEEF) in goat follicles. *Mol. Reprod. Dev.* 2008, 75, 1387-1395.

Adres autora: dr Jarosław Wieczorek, ul. Krakowska 1, 32-083 Balice;
e-mail: jwieczor@izoo.krakow.pl