

Pozyskiwanie i rozwój *in vitro* oocytów kota domowego w świetle współczesnych badań

MAŁGORZATA OCHOTA, WOJCIECH NIŻAŃSKI, JAN TWARDOŃ

Katedra Rozrodu z Kliniką Chorób Zwierząt Gospodarskich Wydziału Medycyny Weterynaryjnej UP,
pl. Grunwaldzki 49, 50-366 Wrocław

Ochota M., Niżański W., Twardoń J.

Current views on isolation and *in vitro* maturation of oocytes in domestic cats

Summary

Currently ART (assisted reproductive technology) is assuming one of the most important places in animal reproduction. Till the present, the main interest concerned the oocytes and embryos in laboratory and in producing animals. Nowadays, with the improvement of ART, as well as gradually increasing interest in endangered species, the interest in using these techniques is shifting toward other animals. Because of this fact, ART procedures concerning domestic cats have progressed significantly in the last years. Domestic cats are a very suitable model for the investigation of endangered feline species. The following paper discusses the current procedures of obtaining oocytes from domestic cats as well as their *in vitro* development.

Keywords: felis catus, cat, oocytes, IVM, *in vitro* maturation

Techniki wspomaganego rozrodu kotów domowych stanowią coraz częściej temat współczesnych badań z zakresu rozrodu. Koty domowe obecnie stają się stopniowo rosnącą grupą zwierząt towarzyszących i stąd wzrastające zainteresowanie hodowców dotyczące poprawy ich zdolności rozrodczych. Ponadto kot domowy stanowi doskonały model wyjściowy do badań nad rozwojem technik wspomaganego rozrodu u dzikich kotowatych, przede wszystkim w przypadku gatunków zagrożonych wyginięciem. Z 37 żyjących obecnie gatunków kotowatych tylko populacja kota domowego (*Felis catus*) nie ulega zmniejszeniu (25). Mimo że pozostałych 36 gatunków wpisanych jest na Czerwoną Listę Zagrożonych Gatunków, a co za tym idzie – stosuje się bardzo restrykcyjne przepisy dotyczących handlu i obrotu tymi zwierzętami oraz produktami ich pochodzenia, ich liczebność stopniowo spada. U zwierząt tych często dochodzi do zaburzeń dotyczących naturalnego rozrodu, co w przypadku niewielkiej liczby żyjących osobników utrudnia, a w praktyce często uniemożliwia, prowadzenie jakichkolwiek badań nad ich rozrodem.

Zupełnie inna sytuacja dotyczy kota domowego (*Felis catus*), którego populacja w wielu krajach jest zbyt duża i stosuje się różne metody jej ograniczania (11, 18, 29). W tej sytuacji badania naukowe dotyczące tych zwierząt podążają w dwóch kierunkach. Z jednej strony, nastawione są na bezpieczne ograniczanie populacji kota domowego (11, 22), a z drugiej, na rozwój technik wspomaganego rozrodu (12, 15, 20, 27), ma-

jących na celu zwiększenie liczby dzikich kotowatych, a także poprawę zdolności rozrodczych kotów hodowlanych. Ze względu na łatwy dostęp do materiału biologicznego, pochodzącego od kota domowego, stanowi on podstawowy model do prowadzenia tego rodzaju badań.

W 1988 r. po raz pierwszy narodziły się kocięta po transferze zarodków otrzymanych w wyniku zapłodnienia *in vitro* (8). Od tego czasu prowadzone są szeroko zakrojone badania w zakresie wspomaganego rozrodu u tego gatunku zwierząt. Już w 2002 r. udało się po raz pierwszy z powodzeniem sklonować kota domowego (30). Na podstawie dotychczasowych wyników skuteczność pozyskiwania *in vitro* zarodków kocich jest porównywalna z wynikami otrzymywanymi u innych gatunków zwierząt, natomiast ich dalszy rozwój *in vivo* po transferze do biorecipientów stwarza nadal liczne problemy. Związane jest to z bardzo niskim odsetkiem ciąży u biorecipientów i niską liczbą urodzonych kociąt. Obecne badania koncentrują się na udoskonaleniu technik wspomaganego rozrodu (ART – assisted reproductive technique) dotyczących pozyskiwania i dojrzewania oocytów *in vitro*, ich zapłodnienia *in vitro* i wczesnej hodowli zarodków *in vitro*, kriokonserwacji i przenoszenia do biorecipientów.

Pozyskiwanie oocytów

W przypadku kota domowego oocyty pozyskiwane są najczęściej z jajników otrzymywanych przy rutynowych zabiegach owariektomii lub owariorhizerek-

tomii, przeprowadzanych bądź to w celach antykoncepcyjnych na życzenie właściciela, bądź w celach leczniczych, w przypadku stanów patologicznych. Większość autorów (4, 15) klasyfikuje otrzymane jajniki w zależności od tego, w jakiej fazie cyklu płciowego się one znajdują, najczęściej stosując dwu- lub czteroklasowe systemy klasyfikacji. Jajniki dzieli się na będące w fazie pęcherzykowej (mające co najmniej jeden widoczny pęcherzyk > 2 mm), w fazie lutealnej (mające jedno lub więcej ciałek żółtych), jajniki świeżo po owulacji (obecne ciało żółte krwotoczne – CH corpus hemorrhagicum), jajniki pośrednie (mające pęcherzyki o wielkości 1-2 mm) oraz jajniki nieaktywne (4). Inni autorzy pozyskane jajniki dzielą na nieaktywne (nieposiadające pęcherzyków o średnicy ≥ 2 mm), jajniki w fazie lutealnej (obecne jedno lub więcej ciałek żółtych) oraz jajniki w fazie pęcherzykowej (obecne jeden lub więcej dojrzałych pęcherzyków o średnicy ≥ 2 mm) (15). Mimo że liczba pęcherzyków pierwotnych i odsetek pęcherzyków rozwijających się w jajniku nie zależy od fazy cyklu płciowego i pory roku, to zdolność rozwojowa w pełni dojrzałych oocytów wydaje się zależna od fazy cyklu rozrodczego dawczyni (4, 12).

Najczęściej stosowaną metodą pozyskiwania oocytów od samicy kota domowego jest nacinanie ostrzem skalpela lub nakłuwanie igłą preparacyjną jajników pozyskanych w trakcie rutynowych zabiegów chirurgicznych (4, 10, 15, 16, 23). Jewgenow i wsp. (12-14) opisują również metodę pozyskiwania oocytów z użyciem sitka tkankowego, w której to metodzie jajniki są mechanicznie rozcierane w obecności odpowiedniego medium, a następnie uzyskaną zawiesinę przeciera się przez sitka o stopniowo malejącej średnicy, a później odwirowuje, w ten sposób pozyskując oocyty. Metoda ta jest szybsza i pozwala na pozyskanie większej liczby pęcherzyków pierwotnych.

Klasyfikacja oocytów

Pozyskane oocyty, a właściwie oocyty wraz z otaczającymi je komórkami wzgórka jajonośnego (COC – cumulus – oocyte complex) są szczegółowo badane i oceniane pod względem ich przyszłej przydatności. Tu najczęściej stosuje się podział na trzy lub cztery klasy na podstawie zabarwienia i granulacji ooplazmy, liczby warstw komórek wzgórka jajonośnego i ich zawartości oraz jakości osłonki przejrzystej. Oocyty zdegenerowane lub pozbawione komórek wzgórka jajonośnego nie są brane pod uwagę.

W przypadku podziału na cztery klasy, do klasy pierwszej i drugiej zalicza się oocyty, w których komórki COC ściśle do siebie przylegają na całej (klasa I) lub prawie całej (klasa II) długości, mają jednolitą, ciemną ooplazmę z równomiernie rozłożonymi ziarnistościami i nienaruszoną osłonką przejrzystą. Oocyty klasy trzeciej i czwartej mają nieco jaśniejszą ooplazmę, ziarnistości rozłożone nierównomiernie z obszarami przejaśnień i są otoczone przylegającymi do sie-

bie na całej (klasa I) lub prawie całej (klasa II) długości komórkami wzgórka jajonośnego (16). W przypadku podziałów trzystopniowych brane są pod uwagę te same parametry i oocyty są klasyfikowane jako: A, B i C w zależności od wybarwienia ooplazmy, ułożenia ziarnistości i jakości wzgórka jajonośnego. Za najlepsze uważa się oocyty klasy A z jednolitą ciemną ooplazmą i licznymi, równomiernie rozłożonymi ziarnistościami oraz zwartym ułożeniem licznych warstw komórek wzgórka jajonośnego. Oocyty typu B mają nieznacznie jaśniejszą ooplazmę i ziarnistości rozłożone mniej równomiernie, a komórki wzgórka jajonośnego pokrywają przynajmniej połowę powierzchni osłonki przejrzystej. Natomiast oocyty klasy C mają jasną ooplazmę z nierównomiernie rozłożonymi ziarnistościami i są częściowo pozbawione komórek wzgórka jajonośnego, przy czym ta ostatnia klasa przez niektórych badaczy nie jest kwalifikowana do dalszych badań (10, 27).

W licznych badaniach dowiedziono, że oocyty z jednolitą, nieprzejrystą, ciemną cytoplazmą, z regularnie rozłożonymi ziarnistościami i kilkoma warstwami komórek wzgórka jajonośnego wykazują znacznie wyższe współczynniki zapłodnienia i bruzdkowania (19, 23). Wyniki dojrzewania (IVM – *in vitro* maturation) w przypadku oocytów klasy C są zwykle bardzo niskie, najczęściej nie są one w stanie zakończyć podziałów mejotycznych i ich pobieranie do dalszych badań wydaje się bezcelowe (9). Stadium metafazy drugiego podziału osiąga ponad połowa oocytów wstępnie zakwalifikowanych jako klasa A lub I/II, natomiast z oocytów klasyfikowanych jako C lub III/IV zaledwie niecała jedna piąta (16, 28).

Dojrzewanie oocytów

Oocyt, aby stać się w pełni kompetentny, musi przejść szereg dynamicznych zmian prowadzących zarówno do osiągnięcia dojrzałości jądrowej, jak i cytoplazmatycznej. Dopiero zakończenie tych obu procesów pozwala na prawidłowe zapłodnienie i później na prawidłowy rozwój zarodka. Niestety, u kota domowego jak dotąd tylko około 50-65% pozyskanych oocytów jest w stanie osiągnąć *in vitro* metafazę II podziału, z czego tylko 20-30% dojrzałych oocytów rozwija się do stadium blastocysty po zapłodnieniu *in vitro* (IVF – *in vitro* fertilisation) (23). W porównaniu do innych gatunków zwierząt nie stanowi to zbyt wysokiego wyniku. Na przykład u świni czy myszy odsetek oocytów osiągających metafazę II podziału wynosi ponad 80%, a u bydła nawet ponad 90%. Z tego względu obecne badania koncentrują się na stworzeniu takich warunków, które pozwalałyby zarówno na zachowanie potencjału i integralności dojrzewających COC, jak i stwarzałyby warunki do prawidłowego przebiegu ich rozwoju (20). Obserwuje się znaczne różnice w zdolności zarodków do bruzdkowania i rozwoju blastocyst. Zdecydowanie gorsze wyniki osiąga się w przypadku oocytów dojrzewających *in vitro*,

w porównaniu do tych dojrzewających *in vivo*, pozyskanych z pęcherzyków przedowulacyjnych. Różnice te tłumaczy się upośledzonymi procesami dojrzewania cytoplazmy lub ich zupełnym brakiem w przypadku oocytów dojrzewających *in vitro* (6). Stwierdzono również, że szanse na rozwój żywego płodu z pozyskanego oocytu maleje znacząco wraz ze wzrostem liczby etapów dojrzewania zachodzących *in vitro* (27).

Powodzenie IVM w przypadku oocytów kocich jest również uzależnione od fazy cyklu jajnikowego, w którym oocyty zostały pozyskane, a także rodzaju dodatkowego czynnika wzrostowego oraz jakości wzgórka jajonośnego w momencie pozyskania (3). Jajniki bezpośrednio po zabiegu są zwykle przechowywane w zbuforowanym roztworze soli fizjologicznej PBS w różnych temperaturach (pokojowej, w 4°C lub w 35°C) do momentu dalszej obróbki (2, 4, 9, 15). Ciekawą rzeczą jest znaczna odporność oocytów kocich na obniżenie temperatury, niespotykana u innych gatunków zwierząt. Z jajników przechowywanych w warunkach chłodniczych (5°C) do 24 h pozyskiwano oocyty, z których 50-60% było w stanie osiągnąć stadium mejozy II podziału, co stanowi wynik bardzo podobny, jak w przypadku oocytów poddanych IVM tuż po ich pozyskaniu z jajników (3, 7, 32). Po kilku lub kilkunastu godzinach, w zależności od warunków doświadczenia, jajniki podlegają dalszej obróbce mającej na celu pozyskanie COC – oocytów z otaczającymi je komórkami wzgórka jajonośnego. W przypadku naturalnych procesów follikulogenezy zachodzących w jajniku, mały pęcherzyk jajnikowy wzrastający rozwija się aż do przekształcenia się w pęcherzyk przedowulacyjny. Fizjologicznie procesy te są regulowane przez czynniki endokrynowe, parakrynowe i autokrynowe. W badaniach *in vitro* oocyty po pozyskaniu z jajników są umieszczane w komercyjnie dostępnych mediach do hodowli komórkowych, z różnymi dodatkami. Poza surowiczą albuminą bydlęcą (BSA – bovine serum albumin) i antybiotykami różni autorzy zalecają dodatek gonadotropin, takich jak: choriogonadotropina (hCG), ludzka gonadotropina menopauzalna (hMG), folikulotropina (FSH) czy luteotropina (LH) (2, 4, 9, 15). Ze względu na wzrastające zainteresowanie biotechnologiami stosowanymi w rozrodzie kotów, większość prowadzonych obecnie projektów badawczych kładzie nacisk na ocenę efektywności dodatku substancji poprawiających rozwój i dojrzewanie oocytów w hodowlach *in vitro*. Najczęściej próbuje się stosować te same preparaty, które sprawdzają się u innych gatunków zwierząt. Udowodniono, że na przykład u myszy spośród wielu czynników wzrostowych najskuteczniejsze we wspomaganie rozwoju małych pęcherzyków jajnikowych są: nabłonkowy czynnik wzrostu EGF (epidermal growth factor) i insulinopodobny czynnik wzrostu IGF-1 (insulin-like growth factor) (1, 31). U bydła natomiast stwierdzono pozytywny wpływ czynnika wzrostu fibroblastów bFGF (basic fibroblast growth factor) na krótkoterminowe dojrzewanie pę-

cherzyków (24). Obecnie sprawdza się ich zastosowanie w przypadku hodowli oocytów pochodzących od kota domowego. Jak dotąd stwierdzono, że mimo iż dodatek EGF nie zwiększa znacząco bruzdkowania po IVF u dobrych jakościowo oocytów, to odsetek zarodków osiągających stadium blastocysty wzrasta znacząco (55% i 43%) w stosunku do oocytów hodowanych bez dodatku EGF (5), ponieważ EGF korzystnie wpływa na dojrzewanie cytoplazmatyczne (21). Natomiast w przypadku dodatku IGF-1 do medium hodowlanego stwierdzono, że odsetek dobrych jakościowo oocytów osiągających metafazę II podziału wzrasta o ok. 20%, przy czym efektu tego nie stwierdzano w przypadku oocytów o gorszej jakości w momencie pozyskania (17).

Badania nad hodowlami komórkowymi koncentrują się obecnie nad sprawdzaniem skuteczności różnych składników mediów do hodowli oraz alternatywnymi układami do hodowli *in vitro*, które będą lepiej zachowywały funkcjonalną integralność COC oraz pozytywnie wpływały na ich żywotność i kompetencje *in vitro*. Jednakże, ze względu na fakt, że aby zapewnić właściwy rozwój i dojrzewanie oocytu, należy poszukiwać dróg pełnej optymalizacji warunków inkubacji *in vitro*, obecne badania skupiają się na kilku najważniejszych strategiach, opracowanych w oparciu o badania morfologiczne, funkcjonalne i molekularne. Szczególną uwagę poświęca się w tym zakresie dodatkom antyoksydantów, nisko- i wysokocząsteczkowych, do mediów służących technikom IVM. W tym świetle bardzo obiecujące są wyniki otrzymane przez Luvoni i Chigoni (20) dotyczące zwiększenia zawartości glutationu (GSH) jako antyoksydantu w mediach hodowlanych oraz wpływania na zawartość cyklicznego adenylozynomonofosforanu cAMP jako substancji regulującej szybkość dojrzewania oocytów.

Posumowanie

Pozyskanie dobrych jakościowo oocytów, a następnie stworzenie im dobrych warunków do dalszego rozwoju stanowi duże wyzwanie dla współczesnej nauki. Od prawidłowego przebiegu tych wczesnych procesów zależy dalszy sukces technik wspomaganego rozrodu. Jak dotąd badania dotyczyły przede wszystkim zastosowania ART u zwierząt laboratoryjnych oraz zwierząt produkcyjnych, przede wszystkim u bydła i świń. Obecnie, wraz z rozwojem biotechnologii oraz wzrostem zainteresowania ochroną ginących gatunków, coraz więcej doświadczeń prowadzonych jest w zakresie dojrzewania *in vitro* oocytów kota domowego, który ze względu na dużą dostępność materiału badawczego stanowi doskonały model do badań. Tego typu próby stanowią podstawę do dalszego rozwoju technik wspomaganego rozrodu, takich jak IVF, a następnie produkcji i hodowli zarodków, co w dalszych etapach może pozwolić na pozyskanie tą drogą potomstwa.

Obecnie skuteczność techniki pozyskiwania zarodków kocich jest już porównywalna do innych, znaczą-

nie szerzej badanych gatunków zwierząt, takich jak bydło czy świnię. Natomiast zdolności rozwojowe zarodków *in vivo* u biorczyń są zdecydowanie niższe. Jak dotąd odsetek ciąży u biorczyń kota domowego oraz liczba żywo urodzonych kociąt są dużo gorsze niż u innych gatunków zwierząt. Wydaje się, że dalsze badania powinny koncentrować się na rozwoju i optymalizacji składu mediów hodowlanych do IVM, doskonaleniu technik transferu zarodków oraz synchronizacji cyku płciowego biorczyń, co powinno pozwolić na stworzenie najbardziej optymalnego środowiska do dojrzewania oocytów, a następnie rozwoju zarodków.

Piśmiennictwo

1. Boland N. L., Gosden R. G.: Effects of epidermal growth factor on the growth and differentiation of cultured mouse ovarian follicles. *J. Reprod. Fertil.* 1994, 101, 369-374.
2. Comizzoli P., Wildt D. E., Pukazhenthil B. S.: In vitro compaction of germinal vesicle chromatin is beneficial to survival of vitrified cat oocytes. *Reprod. Dom. Anim.* 2009, 44, 269-274.
3. Farstad W.: Current state in biotechnology in canine and feline reproduction. *Anim. Reprod. Sci.* 2000, 60-61, 375-387.
4. Freistedt P., Stojkovic M., Wolf E.: Efficient in vitro production of cat embryos in modified synthetic oviduct fluid medium: effects of season and ovarian status. *Biol. Reprod.* 2001, 65, 9-13.
5. Gomez M. C., Pope C. E., Davis A., Harris R. F., Dresser B. L.: Addition of epidermal growth factor (EGF) during in vitro maturation of domestic cat oocytes enhances fertilization frequency and blastocyst development in vitro. *Theriogenology* 2001, 55, 472 (abstract).
6. Gomez M. C., Pope C. E., Harris R. F., Davis A., Mikota S., Dresser B. L.: Births of kittens produced by intracytoplasmic sperm injection of domestic cat oocytes matured in vitro. *Reprod. Fertil. Dev.* 2000, 12, 432-433.
7. Goodrowe K. L., Walker S. L., Ryckman D. P., Mastro Monaco G. F., Hay M. A., Bateman H. L., Waddell W. T.: Piecing together the puzzle of carnivore reproduction. *Anim. Reprod. Sci.* 2000, 60-61, 389-403.
8. Goodrowe K. L., Wall R. J., O'Brien S. J., Schmidt P. M., Wildt D. E.: Developmental competence of domestic cat follicular oocytes after fertilisation in vitro. *Biol. Reprod.* 1988, 39, 355-372.
9. Grabiec A., Faundez R., Max A., Tischner M.: Dojrzewanie in vitro oocytów kota domowego. *Medycyna Wet.* 2007, 63, 318-321.
10. Grabiec A., Modliński J. A.: Pozyskiwanie i klasyfikacja oocytów kocich. *Medycyna Wet.* 2003, 59, 146-149.
11. Howe L. M.: Surgical methods of contraception and sterilization. *Theriogenology* 2006, 66 (3), 500-509.
12. Jewgenow K., Paris M. C. J.: Preservation of female germ cells from ovaries of cat species. *Theriogenology* 2006, 66, 93-100.
13. Jewgenow K., Penfold L. M., Meyer H. H. D., Wildt D. E.: Viability of small preantral ovarian follicles from domestic cats after cryoprotectant exposure and cryopreservation. *J. Reprod. Fertil.* 1998, 112, 39-47.
14. Jewgenow K., Stolte M.: Isolation of preantral follicles from nondomestic cats – viability and ultrastructural investigations. *Anim. Reprod. Sci.* 1996, 44, 183-193.
15. Karja N. W. K., Otoi T., Murakami M., Fahrudin M., Suzuki T.: In vitro maturation, fertilisation and development of domestic cat oocytes at three stages of the reproductive cycle. *Theriogenology* 2002, 57, 2289-2298.
16. Kańska-Książkiewicz L., Ryńska B., Kania G., Smorąg Z., Gajda B., Pieńkowski M.: Timing of nuclear maturation of nonstored and stored domestic cat oocytes. *Theriogenology* 2003, 59, 1567-1574.
17. Kittiyant Y., Saikhun J., Pavasuthipaisit K.: Somatic cell nuclear transfer in domestic cat oocytes treated with IGF-1 for in vitro maturation. *Theriogenology* 2003, 59, 1775-1786.
18. Kutzler M., Wood A.: Non-surgical methods of contraception and sterilization. *Theriogenology* 2006, 66, 514-525.
19. Lengwinat T., Pitra Ch., Blotner S.: Follicular immature oocytes of domestic cat: their fertilization and development competence during coculture of feline oviductal epithelial cells. *The Proc. 12th Internat. Congress on Anim. Reprod.*, Haga 1992, s. 1793-1795.
20. Luvoni G. C., Chigoni S.: Culture strategies for maturation of carnivore oocytes. *Theriogenology* 2006, 66, 1471-1475.
21. Merlo B., Iacono E., Zambelli D., Prati F., Belluzzi S.: Effect of EGF on in vitro maturation of domestic cat oocytes. *Theriogenology* 2005, 63, 2032-2039.
22. Munson L.: Contraception in felids. *Theriogenology* 2006, 66, 126-134.
23. Naoi H., Otoi T., Shimamura T., Karja N. W. K., Agung B., Shimizu R., Taniguchi M., Nagai T.: Developmental competence of cat oocytes from ovaries stored at various temperature for 24 h. *J. Reprod. Dev.* 2007, 53, 271-277.
24. Nuttingk F., Massip A., Dessy F.: In vitro effect of bFGF on isolated bovine preantral follicles: an autoradiographic study. *J. Reprod. Fertil.* 1993, Abstr Ser 12: 57 abstr.
25. Pelican K. M., Wildt D. E., Pukazhenthil B., Howard J. G.: Ovarian control for assisted reproduction in the domestic cat and wild felids. *Theriogenology* 2006, 66, 37-48.
26. Pope C. E.: In vitro fertilisation and embryo transfer in felids. *Methods Mol. Biol.* 2004, 254, 227-244.
27. Pope C. E., Gomez M. C., Dresser B. L.: In vitro production and transfer of cat embryos in the 21st century. *Theriogenology* 2006, 66, 59-71.
28. Pope C. E., McRae M. A., Plair B. L., Keller G. L., Dresser B. L.: In vitro and in vivo development of embryos produced by in vitro maturation and in vitro fertilization of cat oocytes. *J. Reprod. Fertil. Suppl.* 1997, 51, 69-82.
29. Robertson S. A.: A review of feral cat control. *J. Feline Med. Surg.* 2008, 10, 366-375.
30. Shin T., Kraemer D., Pryor J., Liu L., Rugila J., Howe L., Buck S., Murphy K., Lyons, Westhusin M.: A cat cloned by nuclear transplantation. *Nature* 2002, 415, 859.
31. Speras N., Boland N. I., Murray A. A., Gosden R. G.: Mouse oocytes derived from in vitro grown primary ovarian follicles are fertile. *Hum. Reprod.* 1994, 9, 527-532.
32. Wolfe B. A., Wildt D. E.: Development to blastocysts of domestic cat oocytes matured and fertilized in vitro after prolonged cold storage. *J. Reprod. Fertil.* 1996, 106, 135-141.

Adres autora: dr Małgorzata Ochota, pl. Grunwaldzki 49, 50-366 Wrocław; e-mail: malgorzata.ochota@up.wroc.pl