

Czynniki warunkujące potencjał rozwojowy oocytów ssaków – w świetle badań molekularnych i mikrofluidycznych*)

BARTOSZ KEMPISTY, HANNA PIOTROWSKA*, RAFAŁ WALCZAK**,
PATRYCJA ŚNIADEK**, JAN DZIUBAN**, DOROTA BUKOWSKA***, PAWEŁ ANTOSIK***,
MARTA JACKOWSKA***, MAGDALENA WOŻNA***, JĘDRZEJ M. JAŚKOWSKI***

Katedra i Zakład Histologii i Embriologii Wydziału Lekarskiego II UM, ul. Świećckiego 6, 60-781 Poznań

*Katedra Toksykologii Wydziału Farmaceutycznego UM w Poznaniu, ul. Dojazd 30, 60-631 Poznań

**Zakład Mikroinżynierii i Fotowoltaiki Wydziału Elektroniki Mikrosystemów i Fotoniki PWr.,
ul. Zygmunta Janiszewskiego 11/17, 50-372 Wrocław

***Katedra Weterynarii Wydziału Hodowli i Biologii Zwierząt UP, ul. Wojska Polskiego 52, 60-628 Poznań

Kempisty B., Piotrowska H., Walczak R., Śniadek P., Dziuban J., Bukowska D.,
Antosik P., Jackowska M., Woźna M., Jaśkowski J. M.

Factors with an influence on mammalian oocytes developmental potential in light of molecular and microfluidic research

Summary

Several morphological, molecular and cellular changes lead to the differentiation of primordial germ cells (PGC) into gametes, eggs and spermatozoa. This process is followed by the migration of these cells to gonads and several cell division cycles (mitotic and meiotic) as well as cell differentiations where these cells are changed into fully mature gametes. The process of gametes maturation is composed of several stages of specific biochemical changes that include changes in the nucleus as well as the changes in oocyte's cytoplasm. The main factor which determines the formation of the developmental competence of oocytes is the long stage of mRNA and proteins storage (cytoplasmic maturation) that plays the main role in the blastocyst formation process.

In this article selected issues associated with the regulation of each of the stages of oocytes differentiation as well as their influence of selected factors such as follicular size or formation of oocyte's transcriptome have been presented. Moreover, a new-noninvasive system of oocytes/embryos quality assessment by using microfluidic techniques was presented.

Keywords: lab-on-chip, oocytes quality, oocytes developmental potential

Właściwy przebieg oogenezy oraz follikulogenezy jest jednym z najważniejszych etapów wpływających na formowanie zdolnego do rozwoju zarodka. U ssaków, pojedyncze komórki jajowe różnią się znacznie pod względem zdolności do zapłodnienia oraz późniejszego rozwoju zarodka. Proces różnicowania się komórki jajowej do opisywanej wyżej struktury wymaga uruchomienia wielu przemian biochemicznych, molekularnych oraz komórkowych, które są określane jako kompetencja-potencjał rozwojowy (developmental competence). Termin ten obejmuje przemiany,

jakie zachodzą w komórce jajowej, które świadczą o jej zdolności do dojrzewania, zapłodnienia, osiągnięcia stadium blastocysty, implantacji oraz narodzin zdrowego potomstwa (11). Techniki wspomaganego rozrodu u zwierząt, posługując się metodami molekularnymi – jak transkryptomika czy proteomika – umożliwiają dokładne określenie kompetencji rozwojowej. Niestety, z uwagi na ich wysoką inwazyjność w stosunku do analizowanego materiału biologicznego nie mogą być stosowane jako jeden z elementów uzupełniających techniki wspomaganego rozrodu u zwierząt. Z uwagi na brak możliwości powtórnego wykorzystania badanych komórek wciąż poszukuje się nowych

*) Praca finansowana przez Unię Europejską z Europejskiego Funduszu Rozwoju Regionalnego, umowa nr POIG.01.03.01-00-014/08-00.

mało inwazyjnych lub nieinwazyjnych metod umożliwiających określenie potencjału rozrodczego gamet i zarodków (18).

Charakterystyka pierwotnych komórek linii płciowej (primordial germ cells, PGC)

Komórki linii płciowej zapewniają utrwalenie zróżnicowanej informacji genetycznej przekazywanej następnym pokoleniom na skutek zapłodnienia. Podczas rozwoju organizmu wielokomórkowego powstają pierwotne komórki linii płciowej (primordial germ cells), które podczas wielu podziałów różnicują się w plemniki oraz komórki jajowe. Proces ten wymaga uruchomienia szeregu mechanizmów komórkowych i molekularnych, które stają się następnie podstawą zdolności do rozrodu, rozwoju oraz dziedziczenia i utrwalania wybranych cech. W literaturze opisywane są dwie drogi, które prowadzą do wykształcenia w pełni wyspecjalizowanych komórek płciowych. Pierwsza z nich, określana jako „preformation” zakłada, że komórki zarodkowe dziedziczą informację genetyczną z komórki jajowej. Druga teoria, określana jako „epigeneza” wskazuje, że formowanie pluripotentnej komórki odbywa się we wczesnych stadiach rozwoju na skutek sygnałów dostarczanych z otaczających tkanek, których efektem jest powstanie komórki linii płciowej. Badania Saitou i wsp. (33) wykazały, że formowanie komórek płciowych u myszy oraz, jak się sugeruje, u większości ssaków, odbywa się na drodze epigenety. Interesujące jest, że w przypadku obu tych teorii zahamowanie indukcji programu somatycznego wydaje się kluczowym momentem w tym procesie (33). Jednakże sygnały molekularne kierujące tym procesem są różne w poszczególnych grupach organizmów (13, 34). Wykazano także, że proces różnicowania się komórek PGC jest ściśle regulowany ze strony konserwatywnych mechanizmów molekularnych, wpływających na ich proliferację, przeżywalność oraz rozwój, co stanowi dowód na wysoką specyficzność tych mechanizmów u wszystkich gatunków ssaków. Procesy te w znacznym stopniu wpływają na zdolność zarodków do aktywacji genomu zarodkowego, osiągnięcia stadium blastocysty oraz skutecznej implantacji (13, 34).

Istnieją wyniki badań sugerujące, że follikulogeneza jest etapem, który wydaje się kluczowym w osiąganiu przez komórki jajowe pełnego potencjału rozwojowego (12). Przykładem tego jest fakt, że oocyty izolowane z pęcherzyków preantralnych są niezdolne do dokończenia podziału mejotycznego po zatrzymaniu w profazie I, natomiast te pozyskiwane z bardzo małych pęcherzyków antralnych (u bydła < 0,9 mm) są zdolne do wejścia w metafazę I. Komórki jajowe pochodzące z dużych pęcherzyków antralnych osiągają stadium metafazy II (14, 26, 29, 30). Ponadto, oocyty o bardzo zbliżonej budowie morfologicznej izolowane z dużych pęcherzyków antralnych są zdolne do dokończenia etapu dojrzewania jądrowego oraz skutecznego zapłod-

nienia. Wykazują jednocześnie znaczne różnice w zdolności do osiągnięcia stadium blastocysty (5, 14, 22, 26, 29, 30). Wiele badań wskazuje na istnienie trzech hipotez wyjaśniających niewidoczne morfologicznie różnice w kompetencji rozwojowej oocytów. Pierwsza z nich wskazuje na przyczyny tych procesów w pojawiających się uszkodzeniach DNA, włączając w to mitochondrialny DNA (10). Druga obrazuje zmiany epigenetyczne skutkujące niewłaściwym imprintingiem, trzecia natomiast odnosi się do zgromadzenia w komórce jajowej niewystarczającej ilości czynników cytoplazmatycznych (mRNA oraz białka), które skutkują brakiem zdolności do dokończenia etapu dojrzewania cytoplazmatycznego. Wysoce specyficzne zmiany genetyczne i epigenetyczne są trudne do analizowania w aspekcie globalnym, dlatego też większość prowadzonych badań skupia się na czynnikach cytoplazmatycznych (15, 28). Z uwagi na trudność w dostępie do dużej ilości materiału, rzadko wykonuje się analizy proteomiczne. Zmiany o charakterze molekularnym identyfikuje się w formie zmian w transkryptomie komórki jajowej. W wielu opracowaniach wskazuje się na istnienie markerów mRNA kompetencji rozwojowej oocytów.

Rola wybranych markerów mRNA oraz wielkości pęcherzyków jajnikowych w określaniu kompetencji rozwojowej oocytów

Jednym z czynników powiązanych z kompetencją rozwojową oocytów bydłecych jest wielkość pęcherzyków jajnikowych (14, 16, 23, 26, 30). Przytoczone wyniki badań wskazują jednoznacznie, że odsetek zarodków, które osiągają stadium blastocysty jest znacząco wyższy w przypadku, gdy oocyty izolowane są z pęcherzyków większych niż 5 mm, w porównaniu do pęcherzyków małych, o rozmiarach 2-3 mm. Udowodniono, że zarodki osiągające stadium 8-komórkowe, po aktywacji genomu zarodkowego (embryonic genome activation, EGA), na podstawie przeprowadzonych badań z włączaniem ³H-urydyny, posiadają wyciszoną „maszynię” transkrypcyjną (9, 14, 35). Tak więc słusznym wydaje się stwierdzenie, że gromadzony w oocytach materiał matczyny w postaci zmagazynowanego mRNA jest jednym z głównych markerów określających kompetencję rozwojową tych komórek. Najczęściej wymienianymi markerami mRNA potencjału rozwojowego oocytów są geny kodujące czynniki transkrypcyjne, jak: Oct4, Msx1, białko o strukturze palców cynkowych (Znf198), białko wiążące histony (SLBP), cyklina A, białko szoku cieplnego 40/DNA-J (Dja4), białko interreagujące z NEDD4 (NDFIP1), kompleks 3 białek transportujących (Trappc) oraz białko GDF9. Wśród wymienionych wyżej genów, czynniki transkrypcyjne, uczestniczące w regulacji syntezy RNA, wydają się pełnić istotną rolę w magazynowaniu odpowiedniej ilości RNA w dojrzałych oocytach, wpływając tym samym na uzyskiwanie przez te komórki kompetencji. Geny kodujące białka zaan-

gażowane w regulację procesu podziału komórkowego, jak cyklina A, w sposób znaczący wpływają na aktywację genomu zarodkowego. W podobnych badaniach Mourot i wsp. (27) oraz Robert i wsp. (31) wskazują na istotną rolę kolejnych transkryptów w osiągnięciu przez oocyty bydłce zdolności do dojrzewania i aktywacji genomu zarodkowego. Ponadto Mourot i wsp. (27) określili wpływ na te procesy takich czynników, jak: wielkość pęcherzyków jajnikowych oraz pożywki wzbogaconej o FSO. Wykazano również znaczący wpływ wielkości pęcherzyków na ekspresję kolejnych regulatorów cyklu komórkowego, jak: PTTG1 oraz CCNB2. Udowodniono następnie związek ekspresji tych genów z wzrastającą kompetencją rozwojową oocytów oraz stymulację ich ekspresji podczas wczesnych podziałów blastomerów zarodkowych (27). Lonergan i wsp. (25) wykazali, że zarodki we wczesnych stadiach podziałowych charakteryzują się bardzo wysokim potencjałem rozwojowym. Biorąc pod uwagę, że wymienione wyżej geny stanowią jedynie niewielką frakcję wszystkich czynników uczestniczących w procesie kształtowania się kompetencji rozwojowej oocytów, sugeruje się, że proces ten jest regulowany małymi ilościowymi zmianami RNA wielu genów. Tak więc wydaje się słusznym, że pełne określenie kompetencji rozwojowej oocytów wymaga analizy, posługując się mikromacierzami ekspresyjnymi cDNA, całego transkryptomu komórek o zróżnicowanym potencjale rozwojowym (25).

Podobne badania, w których zwierzęciem modelowym były świny, odnoszące się do wpływu wielkości pęcherzyków jajnikowych na ekspresję wybranych genów, zostały przeprowadzone przez Antosika i wsp. (1). W badaniach tych analizowano ekspresję genów kodujących białka odpowiedzialne za zdolność oocytów do zapłodnienia, jak: glikoproteiny osłonki przejrzystej (pZP1, pZP2, pZP3, pZP3 α) oraz integryny (ITGB2, ITGB3). Wyniki przeprowadzonych analiz wskazują, że wielkość pęcherzyków jajnikowych, z jakich pozyskiwane były oocyty, w znacznym stopniu wpływają na ekspresję badanych genów. Najwyższą ekspresję zarówno mRNA, jak i białka wykazano w oocytach pochodzących z dużych pęcherzyków (> 5 mm), w porównaniu do średnich (3-5 mm) oraz małych (< 3 mm). Sugeruje się tym samym, że wielkość pęcherzyków jajnikowych wpływa nie tylko, jak wskazywano dotychczas, na zdolność oocytów do dojrzewania czy osiągnięcia kompetencji rozwojowej, ale i na zdolność tych komórek do zapłodnienia, czego pośrednim dowodem jest ekspresja genów odpowiedzialnych za ten proces (1).

Caixeta i wsp. (7) analizowali wpływ wielkości pęcherzyków jajnikowych na ekspresję wybranych genów, będących potencjalnymi markerami kompetencji rozwojowej oocytów. Badaniom molekularnym poddano takie geny, jak: H1Foo, H2A, H3A, GHR, GDF9, BMP15, OOSP1, których ekspresję analizowano w oocytach oraz FSHR, EGFR, GHR, PTX3,

IGFII w komórkach wzgórka jajonośnego. Wykazano, że odsetek uzyskiwanych blastocyst był znacząco wyższy w przypadku oocytów pozyskiwanych z pęcherzyków większych niż 6 mm. Ponadto ekspresja mRNA H2A wzrastała wraz z wielkością pęcherzyków (wyższa w oocytach pochodzących z pęcherzyków ≥ 8 mm, w porównaniu do pęcherzyków < 6 mm). Podobnie ekspresja mRNA FSHR, EGFR i GHR była zależna od wielkości pęcherzyków, z jakich izolowane były oocyty. Wykazano tym samym, że poziom mRNA H2A jest zależny od wielkości pęcherzyków jajnikowych oraz gen ten może być uznany za marker w określaniu kompetencji rozwojowej komórek jajowych (7).

Badania Rosen i wsp. (32) polegały na wykazaniu zależności pomiędzy wielkością pęcherzyków jajnikowych u kobiet a zdolnością oocytów do dojrzewania, zapłodnienia oraz zarodków do rozwoju. Wyniki przeprowadzonych analiz wskazują na znacząco obniżającą się zdolność do dojrzewania w przypadku oocytów izolowanych z małych pęcherzyków jajnikowych. Podobnie odsetek zapłodnionych oocytów był niższy o 28% w odniesieniu do komórek pochodzących z pęcherzyków jajnikowych o wielkości 16-18 mm. Ponadto procent polispermii wzrastał wraz z obniżającą się wielkością pęcherzyków jajnikowych. Wielkość pęcherzyków jajnikowych nie wpływała na liczbę komórek zarodkowych, aczkolwiek znaczną fragmentację cytoplazmy tych komórek odnotowano w przypadku, gdy zarodki te pochodziły z oocytów izolowanych z małych pęcherzyków (32). Przytoczone wyniki badań sugerują, że oocyty pochodzące z małych pęcherzyków jajnikowych mogą osiągać stadium metafazy II oraz być skutecznie zapłodnione, jednakże procent uzyskiwanych prawidłowych zarodków jest znacznie obniżony w odniesieniu do grupy komórek pozyskiwanych z dużych pęcherzyków jajnikowych.

Osiągnięcie przez oocyty pełnej kompetencji rozwojowej jest uzależnione od zdolności tych komórek do dojrzewania (6). Jednym z głównych czynników warunkujących prawidłowy przebieg tego procesu jest właściwa komunikacja pomiędzy komórkami wzgórka jajonośnego a oocytem. Szlak komunikacji pomiędzy komórkami somatycznymi a gametą regulowany jest obecnością połączeń typu gap junction. Sugeruje się, że połączenia te odgrywają kluczową rolę w złożonym procesie osiągania przez oocyty pełnej kompetencji rozwojowej. Szlak komunikacji pomiędzy komórkami somatycznymi a komórką jajową jest regulowany poprzez specyficzne białka, tworzące strukturę gap junction, należących do grupy koneksyn (conexins, Cx), (głównie jest to koneksyna 43, 45 i 37) oraz kinaz zależnych od cylin (cyclin dependent kinases, Cdk) (3, 4, 24). Jednakże w piśmiennictwie brak było dotychczas informacji odnoszących się do związku pomiędzy wielkością pęcherzyków jajnikowych a ekspresją wybranych białek tworzących strukturę gap junc-

tion. Zagadnienie to stało się przedmiotem badań Antosika i wsp. (4). Wykorzystując model świński, analizowano ekspresję białek Cx43 oraz Cdk4 w oocytach izolowanych z dużych (> 5 mm), średnich (3-5 mm) oraz małych (< 3 mm) pęcherzyków jajnikowych. Wyniki analiz ekspresji białka wykazały wyższy jej poziom w przypadku białka Cdk4 w oocytach izolowanych z dużych pęcherzyków w odniesieniu do średnich oraz małych. Nie wykazano natomiast różnic w ekspresji Cx43 pomiędzy trzema analizowanymi grupami komórek. Badania z wykorzystaniem mikroskopii konfokalnej wskazywały na różną lokalizację białka Cdk4 w zależności od wielkości pęcherzyków jajnikowych, z jakich pozyskiwane były oocyty. Białko Cdk4 wykazywało wyraźną lokalizację błonową oraz w osłonce przejrzystej w przypadku komórek jajowych izolowanych z dużych pęcherzyków, natomiast jego lokalizacja i ekspresja cytoplazmatyczna była szczególnie widoczna w przypadku komórek pochodzących z pęcherzyków średnich oraz małych. Autorzy sugerują, że różna lokalizacja białka Cdk4 w oocytach pozyskiwanych z pęcherzyków jajnikowych różnej wielkości może wskazywać na istnienie specyficznego mechanizmu translokacji tego białka pomiędzy błoną komórkową, osłonką przejrzystą a cytoplazmą oraz że mechanizm ten podlega regulacji ze strony właśnie tego parametru. Ponadto wykazano wyższą ekspresję obydwu analizowanych białek w oocytach po dojrzewaniu *in vitro* (*in vitro* maturation, IVM) w odniesieniu do komórek przed hodowlą, co wskazuje, że różna ekspresja Cx43 i Cdk4 w komórkach niedojrzałych oraz dojrzałych może być wynikiem wpływu IVM na formowanie połączeń typu gap junction (4).

Ocena morfologii oocytów z wykorzystaniem technik molekularnych oraz mikrofluidycznych

Jakość oocytów w sposób istotny wpływa na ich zdolność do dojrzewania, monospermicznego zapłodnienia, rozwoju zarodków w stadium blastocysty oraz prawidłowej implantacji (6). Jednym z najważniejszych elementów określających klasę jakościową oocytów jest ich budowa morfologiczna. W klasyfikacji morfologicznej komórek jajowych uwzględnia się takie elementy, jak: kompleks komórek wzgórka jajonośnego (cumulus complex), ocena stopnia ziarnistości oraz zabarwienie cytoplazmy, ciało kierunkowe, przestrzeń periwitelinową i osłonkę przejrzystą oraz wrzeciono podziałowe (2, 3, 17, 20, 21).

Badania wykazały, że budowa morfologiczna komórki jajowej w istotny sposób wpływa na ekspresję mRNA genów odpowiedzialnych za zapłodnienie u świń (geny kodujące białka osłonki przejrzystej oraz integryny) czy genów odpowiedzialnych za formowanie połączeń typu gap junction (2, 3, 17).

Analizy mikrofluidyczne odnoszące się do pomiarów wartości spektralnych badanych komórek (oocyty, zarodki w stadium przedimplantacyjnym) opierają się na wskaźnikach morfologicznych osłonki przejrzystej

oraz cytoplazmy. Najczęściej wykorzystuje się krzem monokrystaliczny i szkło jako podstawowe materiały służące do wytworzenia systemu lab-on-chip. Mikrocytometr weterynaryjny jest chipem krzemowym z umieszczonymi w nim kanałami mikrofluidycznymi, komorą pomiarową i zintegrowanymi światłowodami włóknistymi. Całość konstrukcji połączona jest ze szklaną pokrywą posiadającą otwory wlotowy i wylotowy, umożliwiające swobodne wprowadzenie i wyjęcie komórki (36, 37).

Parametryczny układ pomiarowy odnosi się do grubości osłonki oraz stopnia ziarnistości i zabarwienia cytoplazmy komórki (36, 37). Uwzględniając te dwa wskaźniki morfologiczne, system mikrofluidyczny określa absorbancję światła przez komórki poddane analizie. Na podstawie wartości absorbancji światła o odpowiedniej – różnej dla poszczególnych typów morfologicznych komórek, określa się właściwości spektralne analizowanej komórki, a następnie odpowiednio się ją klasyfikuje. Opracowany układ pomiarowy stanowi nową, nieinwazyjną metodę oceny jakości oocytów/zarodków. Przeprowadzone wyniki badań, na podstawie wskaźników spektralnych, wskazują, że zarówno wielkość pęcherzyków jajnikowych, jak klasa jakościowa oocytów mają istotny wpływ na odczytywane wartości absorbancji. Dlatego też można w chwili obecnej uznać system mikrofluidyczny za dodatkowe narzędzie badawcze, które w sposób nieinwazyjny dostarcza informacji na temat jakości komórek jajowych oraz zarodków (18).

Podsumowanie

Kompetencja rozwojowa oocytów jest określana przez ich zdolność do dojrzewania (jądrowego i cytoplazmatycznego), zapłodnienia oraz rozwoju zarodków do stadium blastocysty. Wśród czynników w znaczący sposób wpływających na potencjał rozwojowy komórek jajowych wymienia się gromadzenie podczas przebiegu follikulogenezy oraz oogenezy znacznych ilości mRNA oraz białek. Funkcja tych cząsteczek polega głównie na podtrzymywaniu i regulowaniu wielu przemian biochemicznych, molekularnych i komórkowych, skutkujących właściwą implantacją oraz narodzinami zdrowego potomstwa. Oprócz metod biologii molekularnej, służących do oceny kompetencji rozwojowej oocytów, istnieje dodatkowe narzędzie w postaci systemu mikrofluidycznego typu Lab-on-Chip, będące nową, nieinwazyjną techniką służącą do klasyfikacji komórek jajowych/zarodków.

Piśmiennictwo

1. Antosik P., Kempisty B., Bukowska D., Jackowska M., Włodarczyk R., Budna J., Brüßow K. P., Lianeri M., Jagodziński P. P., Jaśkowski J. M.: Follicular size is associated with the levels of transcripts and proteins of selected molecules responsible for the fertilization ability of oocytes of puberal gilts. *J. Reprod. Dev.* 2009, 55, 588-593.
2. Antosik P., Kempisty B., Jackowska M., Bukowska D., Lianeri M., Brüßow K. P., Wozna M., Jaśkowski J. M.: The morphology of porcine oocytes is associated with zona pellucida glycoprotein 3 and integrin beta 2protein levels. *Vet. Med.* 2010, 55, 154-162.

3. *Antosik P., Kempisty B., Jackowska M., Bukowska D., Woźna M., Lianeri M., Brüßow K. P., Jaśkowski J. M.*: Assessment of transcripts and protein contents contributing to cell cycle control and gap junction connections in morphologically variable groups of porcine cumulus-oocyte complexes. *Vet. Med.* 2010, 55, 512-521.
4. *Antosik P., Kempisty B., Jackowska M., Woźna M., Bukowska D., Brüßow K. P., Bryja A., Jaśkowski J. M.*: Are the levels of Cdk4 and Cx43 proteins of porcine oocytes associated with follicular size? *Animal Biology* 2011 (w druku).
5. *Blondin P., Sirard M. A.*: Oocyte and follicular morphology as determining characteristics for developmental competence in bovine oocytes. *Mol. Reprod. Dev.* 1995, 41, 54-62.
6. *Bukowska D., Kempisty B., Antosik P., Jaśkowski J. M., Olechnowicz J.*: Selected aspects of canine oocytes maturation, fertilization and embryo development in dogs. *Medycyna Wet.* 2008, 64, 628-631.
7. *Caixeta E. S., Ripamonte P., Franco M. M., Junior J. B., Dode M. A.*: Effect of follicle size on mRNA expression in cumulus cells and oocytes of *Bos indicus*: an approach to identify marker genes for developmental competence. *Reprod. Fertil. Dev.* 2009, 21, 655-664.
8. *Carabatsos M. J., Sellitto C., Goodenough D. A., Albertini D. F.*: Oocyte-granulosa cell heterologous gap junctions are required for the coordination of nuclear and cytoplasmic meiotic competence. *Develop. Biol.* 2000, 226, 167-179.
9. *Crozet N., Kanka J., Motlik J., Fulka J.*: Nucleolar fine structure and RNA synthesis in bovine oocytes from antral follicles. *Gamete Res.* 1986, 14, 65-73.
10. *Cummins J. M.*: The role of mitochondria in the establishment of oocyte functional competence. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* 2004, 115, 23-29.
11. *Duranthon V., Renard J. P.*: The developmental competence of mammalian oocytes: a convenient but biologically fuzzy concept. *Theriogenology* 2001, 55, 1277-1289.
12. *Eppig J. J.*: Coordination of nuclear and cytoplasmic oocyte maturation in eutherian mammals. *Reprod. Fertil. Dev.* 1996, 8, 485-489.
13. *Extavour C. G., Akam M.*: Mechanisms of germ cell specification across the metazoans: epigenesis and preformation. *Development* 2003, 130, 5869-5884.
14. *Fair T., Hyttel P., Greve T.*: Bovine oocyte diameter in relation to maturational competence and transcriptional activity. *Mol. Reprod. Dev.* 1995, 42, 437-442.
15. *Gresham D., Ruderfer D. M., Pratt S. C., Schacherer J., Dunham M. J., Botstein D.*: Genome-wide detection of polymorphisms at nucleotide resolution with a single DNA microarray. *Science* 2006, 311, 1932-1936.
16. *Hagemann L. J., Beaumont S. E., Berg M., Donnison M. J., Ledgard A., Peterson A. J., Schurmann A., Tervit H. R.*: Development during single IVP of bovine oocytes from dissected follicles: interactive effects of estrous cycle stage, follicle size and atresia. *Mol. Reprod. Dev.* 1999, 53, 451-458.
17. *Jackowska M., Kempisty B., Antosik P., Bukowska D., Budna J., Lianeri M., Rosińska E., Woźna M., Jagodziński P. P., Jaśkowski J. M.*: The morphology of porcine oocytes is associated with zona pellucida glycoprotein transcript contents. *Reprod. Biol.* 2009, 9, 79-85.
18. *Jaśkowski J. M., Kempisty B., Woźna M., Walczak R., Szczepańska P., Dziuban J., Antosik P.*: Wybrane metody oceny kompetencji rozwojowej oraz selekcji oocytów i zarodków bydłęcych. *Medycyna Wet.* 2010, 66, 740-744.
19. *Kastrop P. M., Bevers M. M., Destrée O. H., Kruip T. A.*: Protein synthesis and phosphorylation patterns of bovine oocytes maturing in vivo. *Mol. Reprod. Dev.* 1991, 29, 271-275.
20. *Kempisty B., Antosik P., Bukowska D., Jackowska M., Lianeri M., Jaśkowski J. M., Jagodziński P. P.*: Analysis of selected transcript levels in porcine spermatozoa, oocytes, zygotes and two-cell stage embryos. *Reprod. Fertil. Dev.* 2008, 20, 513-518.
21. *Kempisty B., Antosik P., Bukowska D., Jackowska M., Lianeri M., Jaśkowski J. M., Jagodziński P. P.*: Assessment of zona pellucida glycoprotein and integrin transcript contents in porcine oocytes. *Reprod. Biol.* 2009, 9, 71-78.
22. *Krisher R. L.*: The effect of oocyte quality on development. *J. Anim. Sci.* 2004, 82, 14-23.
23. *Lequarre A. S., Vigneron C., Ribaucour F., Holm P., Donnay I., Dalbès-Tran R., Callesen H., Mermillod P.*: Influence of antral follicle size on oocyte characteristics and embryo development in the bovine. *Theriogenology* 2005, 63, 841-859.
24. *Li T. Y., Colley D., Barr K. J., Yee S. P., Kidder G. M.*: Rescue of oogenesis in Cx37-null mutant mice by oocyte-specific replacement with Cx43. *J. Cell. Sci.* 2007, 120, 4117-4125.
25. *Lonergan P., Khatir H., Piumi F., Rieger D., Humblot P., Boland M. P.*: Effect of time interval from insemination to first cleavage on the developmental characteristics, sex ratio and pregnancy rate after transfer of bovine embryos. *J. Reprod. Fertil.* 1999, 117, 159-167.
26. *Lonergan P., Monaghan P., Rizos D., Boland M. P., Gordon I.*: Effect of follicle size on bovine oocyte quality and developmental competence following maturation, fertilization, and culture in vitro. *Mol. Reprod. Dev.* 1994, 37, 48-53.
27. *Mourot M., Dufort I., Gravel C., Algriany O., Dieleman S., Sirard M. A.*: The influence of follicle size, FSH-enriched maturation medium, and early cleavage on bovine oocyte maternal mRNA levels. *Mol. Reprod. Dev.* 2006, 73, 1367-1379.
28. *O'Neill L. P., Ver Milyea M. D., Turner B. M.*: Epigenetic characterization of the early embryo with a chromatin immunoprecipitation protocol applicable to small cell populations. *Nat. Genet.* 2006, 38, 835-841.
29. *Otoi T., Yamamoto K., Koyama N., Tachikawa S., Suzuki T.*: Bovine oocyte diameter in relation to developmental competence. *Theriogenology* 1997, 48, 769-774.
30. *Pavlok A., Lucas-Hahn A., Niemann H.*: Fertilization and developmental competence of bovine oocytes derived from different categories of antral follicles. *Mol. Reprod. Dev.* 1992, 31, 63-67.
31. *Robert C., Barnes F. L., Hue I., Sirard M. A.*: Subtractive hybridization used to identify mRNA associated with the maturation of bovine oocytes. *Mol. Reprod. Dev.* 2000, 57, 167-175.
32. *Rosen M. P., Shen S., Dobson A. T., Rinaudo P. F., McCulloch C. E., Cedars M. I.*: A quantitative assessment of follicle size on oocyte developmental competence. *Fertil. Steril.* 2008, 90, 684-690.
33. *Saitou M.*: Specification of the germ cell lineage in mice. *Front. Biosci.* 2009, 14, 1068-1087.
34. *Seydoux G., Braun R. E.*: Pathway to totipotency: lessons from germ cells. *Cell* 2006, 127, 891-904.
35. *Sousa P. A. de, Watson A. J., Schultz G. A., Bilodeau-Goeseels S.*: Oogenetic and zygotic gene expression directing early bovine embryogenesis: a review. *Mol. Reprod. Dev.* 1998, 51, 112-121.
36. *Szczepańska P., Walczak R., Dziuban J., Jackowska M., Kempisty B., Jaśkowski J. M., Bargiel S.*: Lab-on-chip quality classification of porcine/bovine oocytes. *Proc. Chemistry* 2009, 1, 341-344.
37. *Szczepańska P., Walczak R., Dziuban J., Kempisty B., Jackowska M., Antosik P., Jaśkowski J., Bargiel S.*: Ocena jakościowa komórek rozrodczych zwierząt hodowlanych z wykorzystaniem mikrocytometru typu lab-chip. *Elektronika* 2010, 6, 93-96.

Adres autora: dr Bartosz Kempisty, ul. Święcickiego 6, 60-781 Poznań;
e-mail: etok@op.pl