

Biotechnologia w rozrodzie koni – perspektywy i ograniczenia

JOANNA KOCHAN, AGNIESZKA NOWAK, ANNA MIGDAŁ, MACIEJ WITKOWSKI

Instytut Nauk Weterynaryjnych, Wydział Hodowli i Biologii Zwierząt, Uniwersytet Rolniczy w Krakowie,
al. Mickiewicza 24/28 30-159 Kraków

Otrzymano 02.04.2015

Zaakceptowano 16.11.2015

Kochan J., Nowak A., Migdał A., Witkowski M.

Biotechnology in equine reproduction: Prospects and limitations

Summary

Assisted reproduction techniques for horses are developing relatively slowly, compared to those for other domestic animals, because of a wide range of species-specific barriers, such as the lack of efficient methods for superovulation, frequent disorders of *in vitro* oocyte maturation, and the absence of standards for *in vitro* embryo culture. Despite these obstacles, attempts are being made to improve various biotechnological methods. In recent years, offspring have been obtained by cloning. A method alternative to the *in vitro* fertilization of oocytes is transfer to recipient mares (GIFT). Methods for oocyte and embryo cryopreservation are being improved. In recent years, there has been a great interest in studies of embryo biopsy for the genetic diagnosis of embryos. Despite promising results of several studies, it is necessary to intensify work on the optimization of methods for *in vitro* embryo production (*in vitro* fertilization, cloning), cryopreservation of gametes and embryos, genetic embryo diagnosis, and artificial insemination of mares with sex-sorted sperm.

Keywords: horses, *in vitro* fertilization, cloning, cryopreservation

Początek rozwoju biotechnologii rozrodu koni datuje się na 1898 r., w którym pojawiło się pierwsze oficjalne doniesienie o skutecznej inseminacji klaczy (24). Od tego czasu nastąpił znaczący postęp w rozwoju technik wspomaganego rozrodu koni, ale niewspółmiernie mały w stosunku do innych gatunków zwierząt gospodarskich. Ma to związek z szeregiem barier gatunkowych charakterystycznych dla koni: specyficzną budową jajnika i brakiem możliwości wywołania superowulacji, a co za tym idzie – ograniczonym dostępem do oocytów, zaburzeniami dojrzewania oocytów w warunkach *in vitro* oraz kapsułą zarodkową uniemożliwiająca manipulacje na zarodkach. Jednak pomimo tych ograniczeń hodowcy koni są zainteresowani wdrożeniem nowoczesnych metod wspomaganego rozrodu do praktyki hodowlanej ze względu na duże korzyści materialne płynące z posiadania wybitnych koni sportowych. Hodowcy chcą jednocześnie wykorzystywać wybitne konie w sporcie i uzyskiwać od nich maksymalną liczbę potomstwa, co bez ingerencji metod biotechnologicznych jest trudne do osiągnięcia. Obecnie najpopularniejsze i najszerzej wykorzystywane w praktyce hodowlanej metody wspomaganego rozrodu to inseminacja, zarówno nasieniem świeżym, jak i mrożonym, oraz transplantacja zarodków świeżych lub przechowywanych krótkotrwale.

Technologie związane z produkcją zarodków końskich *in vitro* rozwinęły się dopiero w ostatnich latach, w momencie, gdy podobne techniki u innych gatunków zwierząt osiągnęły znaczący postęp i znalazły już zastosowanie w praktyce na szeroką skalę. Obecnie trwają prace nad optymalizacją warunków pozaustrojowej produkcji zarodków na drodze zapłodnienia wspomaganego (ICSI) oraz na drodze klonowania somatycznego. Dopracowywane są metody kriokonserwacji oocytów i zarodków oraz ich diagnostyki genetycznej.

Inseminacja i seksowanie nasienia

Najbardziej rozpowszechnioną techniką wspomaganego rozrodu jest inseminacja. W hodowli koni inseminacja od wielu lat jest stosowana na szeroką skalę, jednakże nowym wyzwaniem jest inseminacja dawkami nasienia o obniżonej liczbie plemników. Główną przyczyną podejmowania badań nad inseminacją małymi dawkami jest chęć uzyskiwania potomstwa o określonej płci po zastosowaniu nasienia seksowanego. Procedura sortowania plemników przy pomocy cytometru przepływowego jest bardzo czasochłonna i nie pozwala na uzyskanie dużych dawek inseminacyjnych w krótkim czasie (15 mln plemników/godzinę), co wymusza opracowanie skutecznych metod inse-

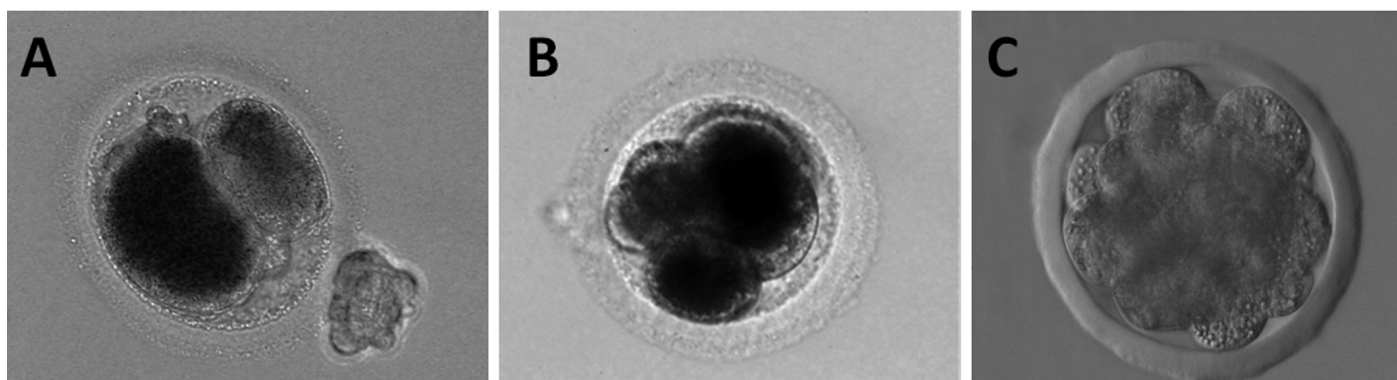
minacji obniżoną liczbą plemników. Obecnie udaje się uzyskać ok. 37% zażrebień dzięki inseminacji histeroskopowej świeżym nasieniem sortowanym przy użyciu dawki 5 mln plemników. Przy użyciu nasienia sortowanego, mrożonego odsetek zażrebień drastycznie spada do ok. 13% (35). Mimo dużego zainteresowania hodowców koni inseminacją nasieniem seksowanym, technika ta wymaga optymalizacji w zakresie procedury sortowania plemników, konserwacji nasienia sortowanego i inseminacji (35, 36).

Zapłodnienie *in vitro*

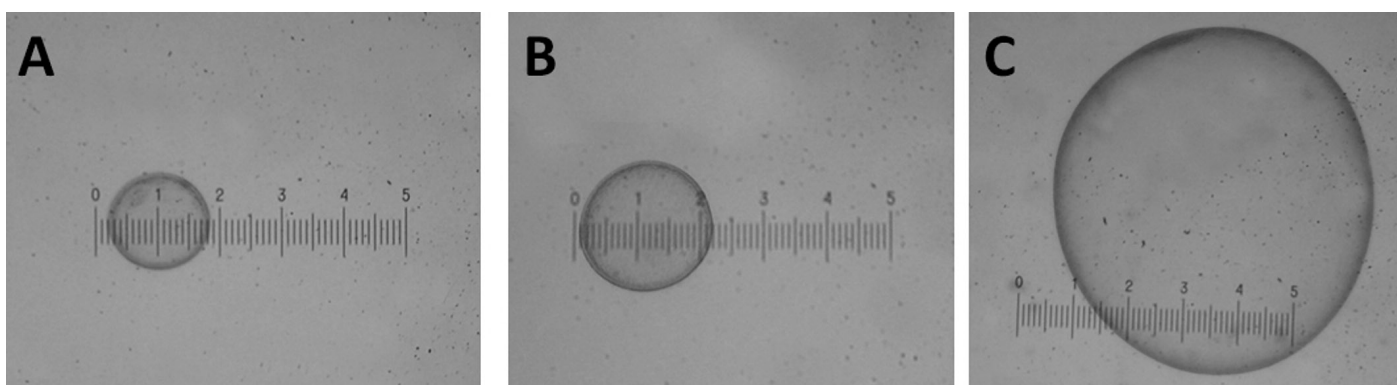
Pierwsze doniesienie o uzyskaniu zarodka końskiego po zapłodnieniu *in vitro* pojawiło się w 1989 r. Oocyty dojrzałe *in vitro* zostały przeniesione do jajowodu klaczy, a następnie klacz została zainseminowana i po 7 dniach przeprowadzono płukanie macicy. Uzyskano w ten sposób zarodki w stadium blastocysty (49). Do dnia dzisiejszego na świat przyszło tylko dwoje źrebiąt po klasycznym zapłodnieniu *in vitro* (IVF – *in vitro* fertilization) przy wykorzystaniu oocytów pobranych z pęcherzyków przedowulacyjnych, a nie oocytów poddanych dojrzewaniu *in vitro* (4, 40). Przypuszcza się, że przyczyną niepowodzeń mogą być zaburzenia podczas dojrzewania *in vitro* oocytów. Około 40-70% oocytów klaczy osiąga metafazę II po dojrzewaniu *in vitro*, podczas gdy oocyty świń, krów czy kóz osiągają metafazę II aż w 90%, (21). Ponadto osłonka przejrzysta ulega specyficznym zmianom podczas hodowli *in vitro*, utrudniając penetrację plemników.

Z powodu niezadowolających wyników klasycznego zapłodnienia (IVF) u koni rozpoczęto wprowadzać techniki zapłodnienia wspomaganego. Li i wsp. (33) przeprowadzili szereg prób polegających na drążeniu otworów w osłonce przejrzystej. Oocyty pobierano od klaczy przyżyciowo metodą OPU (ovum pick-up), a następnie poddano je hodowli *in vitro*. Uzyskano 79% zapłodnionych oocytów, spośród których 455 rozwinęło się do stadium moruli, a 185 osiągnęło stadium blastocysty. Pomimo tak obiecujących wyników nie transplutowano żadnego zarodka do klaczy bioreczeni i nie określono dalszej żywotności i rozwoju zarodków. Pewnym przełomem w produkcji *in vitro* zarodków końskich okazało się zastosowanie metody wspomaganego zapłodnienia metodą ICSI (intracytoplasmic sperm injection), która doprowadziła do narodzin kilkunastu źrebiąt (11, 18, 19, 22, 33, 43). Większość ciąży po ICSI uzyskano transplacując wczesne zarodki do jajowodów klaczy bioreczeni (5, 31, 38). We Włoszech Lazzari i wsp. (32) przeprowadzili bardzo istotne dla praktyki hodowlanej doświadczenie. Wykazali, że dzięki technice docytoplazmatycznej mikroiniekcji plemnika możliwe jest wykorzystywanie w rozrodzie ogierów, które posiadają nasienie bardzo złej jakości, słabo ruchliwe, z uszkodzonymi lub martwymi plemnikami.

Ostatnio zaczęto upatrywać w zapłodnieniu wspomaganym (ICSI) szansy na uzyskanie potomstwa o pożądanej płci po użyciu nasienia sortowanego (seksowanego). W 2008 r. Colleoni wsp. (12) podjęli



Ryc. 1. Zarodki końskie uzyskane w warunkach *in vitro* (ICSI): A – zarodek 2-blastomerowy, B – zarodek 6-blastomerowy, C – zarodek w stadium moruli (fot. J. Kochan, A. Migdal)



Ryc. 2. Zarodki końskie pozyskane *in vivo* w stadium blastocysty: A – zarodek 7-dniowy, B – zarodek 8-dniowy, C – zarodek 9-dniowy (fot. D. Panzani, A. Migdal)

próbę przeprowadzenia ICSI z użyciem mrożonego nasienia sortowanego. Uzyskano sześć blastocyst, spośród których po transplantacji do klaczy biorczyń stwierdzono 4 ciąży. Mimo tak obiecujących wyników odsetek rozwijających się zarodków po użyciu sortowanego nasienia był dużo niższy niż przy użyciu nasienia, które nie jest poddawane skomplikowanej procedurze „seksowania” (20% vs. 70%).

Obecnie hodowla *in vitro* zarodków końskich jest prowadzona w atmosferze 5% CO₂ w pożywkach: TCM 199, Dulbecco Modified Essential Medium (DMEM), DMEM F/12, Menezes B2, G1.2 (2, 8, 19, 33) lub w atmosferze z podwyższonym poziomem azotu (90%) w pożywce DMEM F/12, SOF – syntetyczny płyn jajowodowy (syntetic oviduct fluid) (20). Hodowle zarodków końskich mogą być dodatkowo uzupełniane dodatkami np. komórek granulocy (33, 34), komórek epitelium jajowodu (3) czy trofoblastu (9), jednakże bez względu na rodzaj pożywki przeciętny odsetek blastocyst wyhodowanych w warunkach pozaustrojowych waha się na poziomie 15-30%. Porównując zarodki końskie produkowane *in vitro* z zarodkami *in vivo* stwierdzono mniejszą liczbę i gorszą jakość blastomerów oraz wyższy stopień apoptozy w przypadku zarodków uzyskanych *in vitro* (22). Siedmiodniowe zarodki *in vitro* były mniejsze, posiadały mniej komórek i były bardziej zwarte niż zarodki uzyskane *in vivo* w tym samym wieku. Ponadto blastocysty posiadały mniejszy lub zapadnięty blastocel. Obserwacje te są porównywalne z doświadczeniami na zarodkach bydłych (17, 18).

Transfer gamet do jajowodu – GIFT (gamete intafallopian transfer)

Brak zadowalających wyników zapłodnienia *in vitro* doprowadził do opracowania pośredniej metody zapłodnienia oocytów w jajowodzie klaczy biorczynie. Oocyty pozyskane z pęcherzyków przedowulacyjnych mogą zostać bezpośrednio wprowadzone do jajowodów biorczynie lub jeżeli pochodzą z mniejszych pęcherzyków, mogą zostać poddane dojrzewaniu *in vitro*, a następnie umieszczone w jajowodzie. Przy wykorzystaniu oocytów dojrzewających *in vitro* uzyskano aż 82% ciąży, natomiast po oocytach dojrzewających *in vivo* zaledwie 27% przy inseminacji nasieniem świeżym (6). Po transferze oocytów do jajowodu należy zainseminować klacz domacicznie, a w przypadku, kiedy nasienie jest niskiej jakości, można je umieścić bezpośrednio w jajowodzie razem z oocytem w okolicy bańki jajowodu. W przypadku inseminacji do jajowodowej należy odwirować plazmę nasienia. Kapacytacja plemników nie jest konieczna ani w inseminacji do jajowodowej, ani domacicznej, co dowodzi, że plemniki są zdolne do przejścia procesu kapacytacji po umieszczeniu ich bezpośrednio w jajowodzie (6, 13, 14), deponowanie w jajowodzie nasienia schłodzonego lub mrożonego daje jednak bardzo niski odsetek ciąży (25%, 8%) (13). Mimo to

metoda transferu oocytów stanowi alternatywę dla nieefektywnego zapłodnienia *in vitro* i daje możliwość uzyskania potomstwa od klaczy z obniżoną płodnością.

Klonowanie zarodkowe i somatyczne

W związku z brakiem możliwości wywołania superowulacji u klaczy już w latach 70. zaczęto poszukiwać metod zwiększenia liczby zarodków przeznaczonych do embriotransferu. Do tego celu wykorzystano metodę klonowania zarodkowego poprzez bisekcję blastocysty. Początkowo podejmowane próby kończyły się niepowodzeniami ze względu na kapsułę zarodkową, której uszkodzenie podczas zabiegu prowadziło do śmierci zarodka. Dopiero wykorzystanie do bisekcji zarodków 6-dniowych, które nie posiadały w pełni wykształconej kapsuły, zakończyło się sukcesem (1).

W ciągu ostatniego dziesięciolecia nastąpił znaczący postęp w uzyskiwaniu zarodków końskich na drodze klonowania somatycznego. Otworzyło to przed hodowcami nieograniczone możliwości powielania najcenniejszego materiału genetycznego. W 2003 r. w USA przysły na świat pierwsze sklonowane koniowate. Były to trzy muły urodzone w wyniku rekonstrukcji oocytów za pomocą komórek somatycznych uzyskanych z 45-dniowego płodu (48). Natomiast pierwszym sklonowanym koniem była klacz Prometea urodzona we Włoszech pod koniec 2003 r. Do uzyskania jednego klonu w tym przypadku wykorzystano 300 zrekonstruowanych oocytów, z czego zaledwie 14 rozwinęło się do stadium moruła/blastocysta. Dwa z nich transplantowano do klaczy, od której uzyskano komórki somatyczne, tak więc klacz „Prometea” urodziła „swojego własnego kлона” (20). Sukcesem zakończyło się również klonowanie wałacha „Pieraz”, jednego z trzydziestu tzw. koni wszechczasów, wielokrotnego zwycięzcy najtrudniejszych rajdów długodystansowych, którego ojcem był polski ogier janowskiej hodowli „Pierścień” z linii Kuhailan. Pieraz został wykastrowany w wieku 2 lat, a jego komórki zostały poddane kriokonserwacji i zdeponowane w banku komórek. Z 226 komórek użytych do klonowania uzyskano 34 zarodki, które transplantowano do 12 klaczy biorczyń, uzyskując 3 ciąży, z których jedna zakończyła się urodzeniem ogierka „Pieraz 2” (45). Obecnie na świecie tylko kilka laboratoriów zajmuje się tą procedurą, uzyskując ok. 26% żywo urodzonych źrebiąt w stosunku do transfereowanych zrekonstruowanych oocytów.

Kriokonserwacja oocytów

Rozwój nowoczesnych technik wspomaganie rozrodu uwarunkowany jest dostępem do dużej liczby gamet, dostępność do oocytów klaczy jest jednak ograniczona ze względu na brak możliwości wywołania superowulacji. Opracowanie efektywnych metod kriokonserwacji oocytów daje możliwość magazynowania większej liczby gamet, transportu oocytów na duże odległości, użycia ich w dowolnym terminie, tworzenia rezerw genetycznych. Przełomem w badaniach nad

kriokonserwacją oocytów ssaków okazało się wprowadzenie metod szybkiego zamrażania, czyli witrifikacji, której główną zaletą jest wyeliminowanie tworzenia się kryształków lodu, głównej przyczyny uszkodzeń komórek podczas zamrażania. Dodatkowo, kluczowe okazało się zmniejszenie do minimum objętości mieszaniny witrifikacyjnej, co wpłynęło dodatkowo na skrócenie czasu schładzania. Przeprowadzenie procesu witrifikacji przy minimalnej objętości mieszaniny witrifikacyjnej stało się możliwe dzięki zastąpieniu tradycyjnych słomek takimi narzędziami, jak: OPS (open pulled staws), Cryoloop, Cryotop, Microdrops itp. (7, 16, 37, 39, 41, 47).

W przypadku koni metody tradycyjnej kriokonserwacji „slow freezing” nie przyniosły oczekiwanych rezultatów ze względu na niskie wskaźniki przeżywalności oocytów podczas mrożenia w standardowych słomkach. Dopiero w 2002 r. udało się uzyskać pierwsze źrebię, wykorzystując do zapłodnienia *in vitro* oocyty pozyskane *in vivo* i poddane procesowi witrifikacji, a następnie transferowane do jajowodu (37). Od tamtej pory jedynie kilka ośrodków na świecie jest w stanie sporadycznie uzyskiwać źrebięta po zapłodnieniu *in vitro* oocytów poddanych wcześniej procesowi witrifikacji. W związku z tym, w przypadku koni metody witrifikacji oocytów wymagają dopracowania i uzyskania przekonujących wyników umożliwiających wdrożenie do praktyki hodowlanej.

Kriokonserwacja zarodków

Pierwsze ciąży po witrifikacji zarodków koni uzyskano w 1994 r. (26). Badania ostatnich 20 lat doprowadziły do rozwoju nowych metod kriokonserwacji w minimalnych objętościach mieszanin witrifikacyjnych, które znacznie zmniejszyły negatywne skutki działania niskich temperatur poprzez skrócenie czasu schładzania (28, 30). Dzisiaj stosowane są ultraszybkie metody witrifikacji zarodków koni takie jak: OPS (open pulled straw), Cryoloop, Cryotop, Rapid-I (15, 23, 30, 38, 39, 46).

Badania nad kriokonserwacją zarodków koni skupiają się obecnie nad poprawą efektywności mrożenia zarodków większych niż 300 μm . Zarodki poniżej 300 μm średnicy są w fazie moruli lub wczesnej blastocysty i dobrze znoszą proces kriokonserwacji. Zarodki w tych stadiach należy pozyskiwać w 6. dniu po owulacji, co niesie ryzyko, że będą zbyt małe i trudne do odszukania, lub że nie zeszły jeszcze do macicy i płukanie może być nieefektywne. Optymalnym momentem płukania macicy w celu pozyskania zarodka jest dzień 7., 8. po owulacji, jednakże zarodki w tych dniach mają już dużo większą średnicę, ich blastocel wypełniony jest dużą ilością płynu i są otoczone w pełni wykształconą kapsułą zarodkową (44). Uważa się, iż kapsuła zarodkowa ogranicza wnikanie krioprotektorów do wnętrza zarodka, a duża ilość płynu w blastocelu wydłuża tempo schładzania, co skutkuje słabą przeżywalnością zarodków. Hochi i wsp. (26)

uzyskali sześć ciąż z ośmiu witrifikowanych zarodków mniejszych niż 300 μm , ale tylko dwie z ośmiu zarodków większych niż 300 μm . Rozwiązania tego problemu zaczęto szukać w nakłuwaniu blastocyst w celu zmniejszenia ilości płynu, jednakże podczas nakłucia dochodzi do przerwania ciągłości kapsuły zarodkowej, co często skutkuje śmiercią zarodka. Obecnie rozwiązanie tego problemu stanowi jedno z największych wyzwań w badaniach nad biotechnologicznymi metodami wspomagania rozrodu koni.

Diagnostyka genetyczna zarodków

W 2009 r. opublikowano pełny genom konia domowego i wskazano w nim geny związane z 40 chorobami koni oraz ponad 20 genów odpowiadających za fenotyp (10). Od tamtego czasu podejmowano liczne próby pobrania blastomerów z wczesnych zarodków w celu przeprowadzenia ich diagnostyki genetycznej (8, 25, 27). Opracowanie efektywnych metod wczesnej diagnostyki genetycznej daje hodowcom możliwość uzyskania potomstwa wolnego od chorób warunkowanych genetycznie, o pożądanej płci, umaszczeniu i dowolnie wybranych cechach. Stosując różne techniki pobierania biopsji zarodków przy użyciu mikroostrzy lub mikropipet uzyskiwano wyniki ok. 50% ciąż po transferze zarodków bezpośrednio po biopsjach (8, 42). Problemem okazało się przechowywanie zarodków do czasu uzyskania wyników analizy genetycznej pobranych blastomerów oraz poddawanie biopsjom zarodków powyżej 300 μm średnicy z w pełni wykształconą kapsułą zarodkową. Świeże zarodki po biopsji mogą być przechowywane przez 7-10 godzin bez znaczącego wpływu na odsetek uzyskanych ciąż, jednakże jest to bardzo krótki czas na wykonanie pełnych analiz genetycznych, szczególnie jeżeli nie mogą one być wykonane w tym samym laboratorium (8). Próbowano rozwiązać ten problem, poddając zarodki po biopsjach procesowi kriokonserwacji, jednak do dnia dzisiejszego nie uzyskano satysfakcjonujących rezultatów. Dotychczas udało się określić optymalną wielkość zarodków oraz minimalną liczbę blastomerów niezbędnych do przeprowadzenia analiz genetycznych bez obniżenia kompetencji rozwojowych zarodka. Według Seidla (42) i wsp., zarodki mniejsze niż 300 μm poddane biopsjom zachowują swoje kompetencje rozwojowe na takim samym poziomie, jak zarodki nie poddane biopsji, natomiast zarodki powyżej 300 μm średnicy poddane biopsjom, dają bardzo niski odsetek ciąż po transferze w porównaniu do zarodków takich samych rozmiarów nie poddanych żadnym manipulacjom.

Nowoczesne metody wspomagania rozrodu otwierają przed hodowcami koni ogromne możliwości, takie jak: uzyskiwanie potomstwa od osobników z obniżoną płodnością lub w skrajnych przypadkach od osobników nieplodnych, uzyskiwanie potomstwa o pożądanych cechach oraz magazynowanie i dystrybucję gamet i zarodków. Mimo obiecujących wyników wielu badań konieczne jest zintensyfikowanie prac nad opty-

malizacją metod pozaustrojowej produkcji zarodków (załodnienie *in vitro*, klonowanie), kriokonserwacją gamet i zarodków, ich diagnostyką genetyczną oraz inseminacją seksowanym nasieniem.

Piśmiennictwo

- Allen W. R., Pashen R. N.: Production of monozygotic (identical) horse twins by embryo micromanipulation. *J. Reprod. Fert.* 1984, 71, 607-613.
- Azuma T., Choi Y. H., Hochi S., Oguri N.: Effect of glucose in the culture medium on development of horse oocytes matured and microfertilized in vitro. *Reprod. Fert. Dev.* 1995, 7, 1067-1071.
- Battut I., Bézard J., Palmer E.: Establishment of equine oviduct cell monolayers for co-culture with early equine embryos. *J. Reprod. Fert. Suppl.* 1991, 44, 393-403.
- Bezard J., Magistrini M., Duchamp G., Palmer E.: Chronology of equine fertilization and embryonic development in vivo and in vitro. *Equine Vet. J.* 1989, 8, 105-110.
- Carnevale E. M., Ginther O. J.: Defective oocytes as a cause of subfertility in old mares. *Biol. Reprod. Monograph.* 1995, 1, 209-214.
- Carnevale E. M., Maclellan L. J., Coutinho da Silva M. A., Scott T. J., Squires E. L.: Comparison of culture and insemination techniques for equine oocyte transfer. *Theriogenology* 2000, 54, 981-987.
- Chen S. U., Lien Yr., Cheng Y. Y.: Vitrification of mouse oocytes using closed pulled straws (CPS) achieves a high survival and preserves good patterns of meiotic spindles, compared with conventional straws, open pulled straws and grids. *Hum. Reprod.* 2001, 16, 2350-2356.
- Choi Y. H., Gustafson-Seabury A., Velez I. C., Hartman D. L., Bliss S., Riera F. L.: Viability of equine embryos after puncture of the capsule and biopsy for preimplantation genetic diagnosis. *Reproduction* 2010, 140, 893-902.
- Choi Y. H., Love C. C., Varner D. D., Thompson J. A., Hinrichs K.: Activation of cumulus-free equine oocytes: effect of maturation medium, calcium ionophore concentration and duration of cycloheximide exposure. *Reproduction* 2001, 122, 177-183.
- Chowdhary B. P.: *Equine Genomics*. Wiley-Blackwell, New York, USA 2013.
- Cochran R., Meintjes M., Reggio B., Hylan D., Carter J., Pinto C., Paccamonti D., Godke R. A.: Live foals produced from sperm-injected oocytes derived from pregnant mares. *J. Equine Vet. Sci.* 1998, 18, 736-741.
- Golleoni S., Spinaci M., Duchi R., Merlo B., Tamanini C., Lazzari G., Mari G., Galli C.: ICSI of equine oocytes with sex-sorted frozen-thawed semen results in low cleavage rate but normal embryo development and pregnancies. *Reprod. Fert. and Develop.* 2008, 21, 228-229.
- Coutinho da Silva M. A., Carnevale E. M., Maclellan L. J., Preis K. A., Seidel G. E., Squires E. L.: Effect of time of oocyte collection and site of insemination on oocyte transfer in mares. *J. Anim. Sci.* 2002, 80, 1275-1279.
- Coutinho da Silva M. A., Carnevale E. M., Maclellan L. J., Preis K. A., Seidel G. E., Squires E. L.: Oocyte transfer in mares with intrauterine or intraoviductal insemination using fresh, cooled and frozen stallion semen. *Theriogenology* 2004, 61, 705-713.
- Desai N. N., Goldberg J. M., Austin C., Falcone T.: The new Rapid-i carrier is an effective system for human embryo vitrification at both the blastocyst and cleavage stage. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 2013, 15, 11-14.
- Dinnyes A., Dai Y., Jiang S.: High developmental rates of vitrified bovine oocytes following parthenogenetic activation, in vitro fertilization, and somatic cell nuclear transfer. *Biol. Reprod.* 2000, 63, 513-518.
- Fair T., Lonergan P., Dinnyes A., Cottell D., Hyttel P., Ward F. A., Boland M. P.: Ultrastructure of bovine blastocysts following cryopreservation: effect of method of embryo production on blastocyst quality. *Mol. Reprod. Dev.* 2001, 58, 186-195.
- Galli C., Colleoni S., Duchi R., Lagutina I., Lazzari G.: Developmental competence of equine oocytes and embryos obtained by in vitro procedures ranging from in vitro maturation and ICSI to embryo culture, cryopreservation and somatic cell nuclear transfer. *Anim. Reprod. Sci.* 2007, 17, 39-55.
- Galli C., Crotti G., Turini P., Duchi R., Mari G., Zavaglia G., Duchamp G., Deels P., Lazzari G.: Frozen-thawed embryos produced by ovum pick up of immature oocytes and ICSI are capable to establish pregnancy in the horse. *Theriogenology* 2002, 58, 705-708.
- Galli C., Lagutina I., Crotti G., Colleoni S., Turini P., Ponderato N., Duchi R., Lazzari G.: Pregnancy: a cloned horse born to its dam twin. *Nature* 2003, 16, 425-480.
- Goudet G., Belin F., Młodawska W., Bezard J.: Influence of epidermal growth factor on in vitro maturation of equine oocytes. *J. Reprod. Fert.* 2000, 56, 483-492.
- Gronthal C., Hansen T., Hossanini A., Heinze I., Greve T., Hyttel P.: Intracytoplasmic sperm injection of in vitro matured equine oocytes. *Biol. Reprod.* 1997, 57, 1495-1501.
- Hashimoto S., Amo A., Hama S., Ohsumi K., Nakaoka Y., Morimoto Y. A.: Closed system supportsthe developmental competence of human embryos after vitrification: Closed vitrification of human embryos. *J. Assist. Reprod. Genet.* 201, 30, 371-376.
- Heape W.: On the artificial insemination of mares. *Veterinarian* 1989, 71, 202-212.
- Herrera C., Morikawa M. I., Bello M. B., von Meyeren M., Centeno J. E., Dufourq P., Martinez M. M., Llorente J.: Setting up equine embryo gender determination by preimplantation genetic diagnosis in a commercial embryo transfer program. *Theriogenology* 2014, 81, 758-763.
- Hochi S., Fujimoto T., Braun J., Oguri N.: Pregnancies following transfer of equine embryos cryopreserved by vitrification. *Theriogenology* 1994, 42, 483-488.
- Huhtinen M., Peippo J., Bredbacka P.: Successful transfer of biopsied equine embryos. *Theriogenology* 1997, 48, 361-367.
- Kuwayama M., Vajta G., Ieda S., Kato O.: Comparison of open and closed methods for vitrification of human embryos and the elimination of potential contamination. *Reprod. Biomed.* 2005, 11, 608-614.
- Lane M., Gardner D. K.: Vitrification of mouse oocytes using a nylon loops. *Mol. Reprod. Dev.* 2001, 58, 342-347.
- Lane M., Schoolcraft W. B., Gardner D. K., Phil D.: Vitrification of mouse and human blastocysts using a novel cryoloop container-less technique. *Fert. Steril.* 1999, 72, 1073-1078.
- Lazzari G., Colleoni S., Lagutina I., Crotti G., Turini P., Tessaro I., Brunetti D., Duchi R., Galli C.: Short-term and long-term effects of embryo culture in the surrogate sheep oviduct versus in vitro culture for different domestic species. *Theriogenology* 2010, 73, 748-757.
- Lazzari G., Grotti G., Turini P., Duchi R., Mari G., Zavaglia G.: Equine embryos at the compacted morula and blastocyst stage can be obtained by intracytoplasmic sperm injection (ICSI) of in vitro matured oocytes with frozen-thawed spermatozoa from semen of different fertilities. *Theriogenology* 2002, 58, 709-712.
- Li X., Meintjes M., Graff K. J., Paul J. B., Denniston R. S., Godke R. A.: In vitro fertilization and development of in vitro matured oocytes aspirated from pregnant mares. *Biol. Reprod. Monograph.* 1995, 1, 309-317.
- Li X., Morris L. H. A., Allen W. R.: Influence of co-culture during maturation on the developmental potential of equine oocytes fertilised by intracytoplasmic sperm injection (ICSI). *Reproduction* 2001, 121, 925-932.
- Lindsey A. C., Bruemmer J. E., Squires E. L.: Low dose insemination of mares using non-sorted and sex-sorted sperm. *Anim. Reprod. Sci.* 2001, 68, 279-289.
- Lindsey A. C., Schenk J. L., Graham J. K., Bruemmer J. E., Squires E. L.: Hysteroscopic insemination of low numbers of flow sorted fresh and frozen/thawed stallion spermatozoa. *Equine Vet. J.* 2002, 34, 121-127.
- Maclellan L. J., Carnevale E. M., Coutinho da Silva M. A., Scoggin C. F., Bruemmer J. E., Squires E. L.: Pregnancies from vitrified equine oocytes collected from super-stimulated and non-stimulated mares. *Theriogenology* 2002, 58, 911-919.
- McKinnon A. O., Lacham-Kaplan O., Trounson A. O.: Pregnancies produced from fertile and infertile stallions by intracytoplasmic sperm injection (ICSI) of single frozen-thawed spermatozoa into in vivo matured mare oocytes. *J. Reprod. Fert.* 2000, 56, 513-517.
- Nowak A., Kochan J., Papis K., Okólski A.: Studies on survival of horse oocytes after Rapid-I method vitrification. *J. Equine Vet. Sci.* 2014, 34, 675-679.
- Palmer E., Bezard J., Magistrini M., Duchamp G.: In vitro fertilization in the horse: A retrospective study. *J. Reprod. Fert.* 1991, 44, 375-384.
- Papis K., Shimizu M., Izaike Y.: Factors affecting the survivability of bovine oocytes vitrified in droplets. *Theriogenology* 2000, 54, 651-658.
- Seidel G. E., Cullingford E. L., Stokes J. E., Carnevale E. M., McCue P. M.: Pregnancy rates following transfer of biopsied and/or vitrified equine embryos: evaluation of two biopsy techniques. *Anim. Reprod. Sci.* 2010, 121, 297-298.
- Squires E. L., Wilson J. M., Kato H.: A pregnancy after intracytoplasmic sperm injection into equine oocytes matured in vitro. *Theriogenology* 1996, 45, 306 (Abstr.)
- Stout T. A. E.: Cryopreservation of equine embryos: Current state-of-the-Art. *Reprod. Dom. Anim.* 2012, 47, 84-89.
- Tischner M.: *Biotechnologia w rozrodzie koni. Życie weterynaryjne* 2006, 81, 19-31.
- Vajta G., Holm P., Greve T., Callesen H.: Vitrification of porcine embryos using the open pulled straw (OPS) method. *Acta Vet. Scand.* 1997, 38, 349-352.
- Vajta G., Holm P., Kuwayama M.: Open pulled straws (OPS) vitrification: a new way to reduce cryoinjuries of bovine ova and embryos. *Mol. Reprod. Dev.* 1998, 51, 53-58.
- Woods G. L., White K. L., Vanderwall D. K., Li G.-P., Aston K. I., Bunch T. D., Meerdo L. N., Pate B. J.: A mule cloned from fetal cells by nuclear transfer. *Science* 2003, 301, 1063-1065.
- Zhang J. J., Boyle M. S., Allen W. R., Galli C.: Recent studies on in vitro fertilization of in vitro matured horse oocytes. *Equine Vet. J.* 1989, 8, 101-104.

Adres autora: dr inż. Joanna Kochan, Al. Mickiewicza 24/28, 30-159 Kraków; e-mail: kochanjoanna@wp.pl