



Dotychczasowe osiągnięcia i perspektywy hodowli przed- i wczesnoantralnych pęcherzyków jajnikowych ssaków

Lucyna Kątska-Książkiewicz

Zakład Fizjologii Rozrodu Zwierząt, Instytut Zootechniki,
Balice k. Krakowa

Long-term culture preantral and early antral ovarian follicles in mammals- perspectives and recent development

Summary

The ovary of mammal contains thousands of oocytes enclosed in the preantral and early antral follicles. Since more than 99% of ovarian oocytes undergo atresia, it would be of great practical benefit if these follicles could be rescued by a long-term *in vitro* culture leading to provide an additional source of gametes and allowing for more efficient improvement of the reproductive potential of female. Until now, research on the isolated preantral follicles are the best developed in rodents. In mouse, investigations have led to follicle growth and antrum formation, ovulation *in vitro* and even to a few live kids after *in vitro* maturation and fertilization of the oocytes recovered from *in vitro* cultured preantral and even primordial follicles. Recently, some progress in the development of methods that allow obtaining competent oocytes and, after IVF, even blastocysts was shown in farm animals. However, only follicles with selected size can be utilized for these purposes. The successful results are encouraging for further development of methods for culture of preantral follicles in farm animals. In the article, techniques of follicle recovery, *in vitro* culture systems, methods for evaluation of oocyte growth, quality and competence for maturity and IVF including our impact in development of presented methods are discussed.

Key words:

ovarian follicles, recovery, culture, growth and competence of oocyte.

Adres do korespondencji

Lucyna
Kątska-Książkiewicz,
Zakład Fizjologii Rozrodu
Zwierząt
Instytut Zootechniki,
32-083 Balice k. Krakowa,
e-mail:
lkatska@izoo.krakow.pl

1. Wprowadzenie

Jajnik ssaka zawiera tysiące, a nawet setki tysięcy pęcherzyków w różnych stadiach rozwoju. Każdy pęcherzyk jajnikowy jest strukturalną i funkcjonalną jednostką jajnika. Zbudowany jest z oocyty, otoczonego przez komórki ziarniste oraz błonę podstawną z przylegającymi do niej komórkami osłonki. Prawidłowy wzrost i dojrzewanie oocyty jest wynikiem wielu interakcji komórkowych zachodzących w obrębie pęcherzyka. W efekcie tych interakcji powstaje specyficzne środowisko, w którym następuje dojrzewanie oocyty, bądź też, co zachodzi częściej, oocyt ulega atrezji. Przeważająca liczba pęcherzyków jajnikowych sięgająca nawet 99,9% ginie w wyniku atrezji w różnych stadiach rozwoju (1,2), a jedynie 0,05% dojrzewa do owulacji (3,4).

W dotychczas opracowanych metodach pozaustrojowego uzyskiwania zarodków ssaków oocyt pobiera się z dużych antralnych pęcherzyków lub też z pęcherzyków przedowulacyjnych, które stanowią mniej niż 5% populacji pęcherzyków jajnikowych. Natomiast ponad 95% tej populacji stanowią pęcherzyki pierwotne i przedantralne (4). U większości gatunków ssaków pula pęcherzyków jajnikowych zostaje ustalona już w jajnikach płodu, a u noworodków gryzoni wkrótce po urodzeniu (5). W ciągu życia osobnika pęcherzyki pierwotne podlegają nieustannej rekrutacji do puli pęcherzyków rosnących. Skutkiem tego procesu jest stopniowa redukcja liczby pęcherzyków, a najbogatszym źródłem pęcherzyków są jajniki młodych zwierząt. W odniesieniu do liczby pęcherzyków występuje istotna zmienność między gatunkami, a także między osobnikami w obrębie gatunku. W bydłych jajnikach płodowych liczba pęcherzyków może zmieniać się od 18 tys. do 200 tys., u nowo narodzonego cielęcia wynosi średnio 235 000, jednakże w populacji 69 osobników obserwowano wahania od 0 do 724 000 (6), natomiast u krów 4-letnich średnio od około 77 000 (7) do 130 000 (6).

Możliwość wykorzystania pęcherzyków z wczesnych stadiów rozwojowych drogą ich pozyskiwania, a następnie długotrwałej hodowli *in vitro* byłaby nowym źródłem gamet żeńskich, a potencjał gametotwórczy jajnika byłby maksymalnie wykorzystany.

Pierwsze prace nad uzyskiwaniem i hodowlą pęcherzyków przedantralnych przeprowadzono na myszach i szczurach, a pionierska publikacja z tego zakresu została opublikowana przez Groba w 1964 r (8). U myszy, badania nad izolacją i hodowlą pęcherzyków przedantralnych doprowadziły do opracowania metod wzrostu i dojrzewania pęcherzyków, ich owulacji *in vitro*, do uzyskania potomstwa po zapłodnieniu *in vitro* oocytów uzyskiwanych z hodowanych pęcherzyków przedantralnych (9), a także pierwotnych (10). Osiągnięcia w tym zakresie uzyskane u myszy zachęciły nas do prowadzenia badań nad hodowlą pęcherzyków przedantralnych, pozyskiwanych z jajników zwierząt gospodarskich.

2. Uzyskiwanie pęcherzyków jajnikowych

Pierwszym warunkiem niezbędnym do opracowania skutecznych metod hodowli pęcherzyków jest opanowanie metod ich uzyskiwania. Jest to zadanie trudne zarówno ze względu na małe rozmiary pęcherzyków i ich delikatną strukturę, a tym samym znaczną podatność na uszkodzenia, jak i utrudnienia wynikające z lokalizacji pęcherzyków we włóknistej stromie jajnikowej, zwłaszcza u kóz, owiec, bydła i kłaczy. Pęcherzyki uzyskuje się przy użyciu: a) metody enzymatycznej; b) izolacji mechanicznej przy użyciu rozdrabniacza tkanek i/lub igieł preparacyjnych. Enzymatyczne metody izolacji pęcherzyków przy użyciu pronazy, kolagenazy i/lub trypsyny stosowano zarówno u zwierząt laboratoryjnych (mysz – 11-15; szczur – 16; chomik – 17; królik – 18) jak i u świni (19,20), kota (21), płodów bydłecych (22), a także u ludzi (23). Metody te, chociaż efektywne, prowadzą do uzyskania nie pęcherzyków, a oocytów otoczonych komórkami ziarnistymi lub komórkami wzgórka jajonowego, gdyż większość komórek osłonki pęcherzyka i błony podstawnej ulega degradacji pod działaniem enzymów.

Mechaniczna metoda izolacji pęcherzyków z kory jajnika przy użyciu specjalnie skonstruowanego ostrza tnącego (24) lub rozdrabniacza tkanek tzw. *tissue chopper*, tnącego tkankę na fragmenty o pożądanej długości (25-28) prowadzi do uzyskania mieszanej pod względem wielkości populacji pęcherzyków, o średnicy wynoszącej od 30 do 100 μm . Do istotnych mankamentów tej metody zaliczyć należy brak możliwości uzyskania większych pęcherzyków przedantralnych o średnicy $>100 \mu\text{m}$ czy pęcherzyków wczesnoantralnych. Ponadto, w badaniach ultrastruktury wykonanych w mikroskopie elektronowym wykazano obecność znacznych uszkodzeń oocytów uzyskanych przy użyciu tej techniki (29).

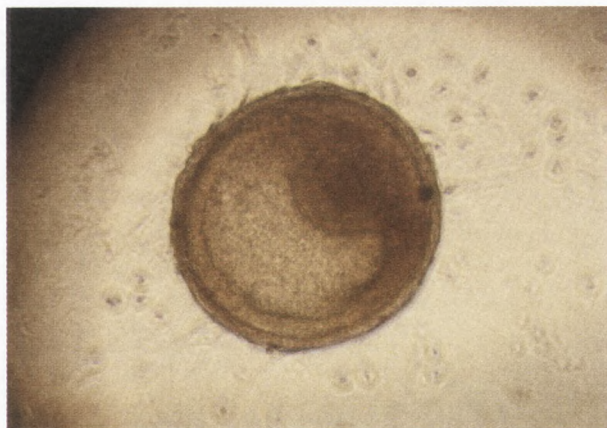
Izolacji pęcherzyków przedantralnych o większych wymiarach, czy też wczesnoantralnych, można dokonać jedynie za pomocą mikrodysekcji, tzn. izolacji pęcherzyków poprzez ich wyłuskiwanie ze stromy jajnika za pomocą cienkich igieł preparacyjnych, pod kontrolą mikroskopu stereoskopowego. W przypadku jajników o luźniejszej strukturze, np. myszy, izolację przeprowadza się na całym jajniku (30), w przypadku większych i bardziej włóknistych jajników, np. owczych lub bydłecych, sporządza się cienkie skrawki tkanki korowej, z których następnie wypreparowuje się pęcherzyki za pomocą cienkich igieł (31-36). Mikrodysekcja nie wymaga stosowania enzymów, ale jej wydajność zależy oczywiście od sprawności manualnych operatora. Może on wyizolować w ciągu 2-3 godz. nawet około 50 pęcherzyków (33). Najmniejsze pęcherzyki, które udaje się uzyskać przy użyciu mikrodysekcji, mają średnicę ok. 100 μm (31-33). Najczęściej w ten sposób izoluje się pęcherzyki o średnicy od 125 do 274 μm . W badaniach prowadzonych przez Kątską i wsp. (31-33) wykazano, że pęcherzyki o tej wielkości stanowią ok. 70% całkowitej populacji małych pęcherzyków uzyskanych z jajników bydłecych.

3. Hodowla pęcherzyków

Pęcherzyki mogą być hodowane w różnych systemach hodowli, a mianowicie: a) w systemie trójwymiarowym, zapewniającym zachowanie struktury przestrzennej pęcherzyka, po zatopieniu w kropli agaru lub kolagenu (3,17,27,28,37,38); b) w systemie dwuwymiarowym, tj. na specjalnych membranach czy w naczynkach pokrytych warstwą substratu, np. żelu kolagenowego, fibronektyny, lamininy lub agaru (9,25,27,28,35,36); c) bez substratu, w mikrokroplach pożywki, w V-oczkach płytek 96-oczkowych (31-33,39) lub na szalkach Petriego (34); d) w hodowli tkankowej cienkich skrawków warstwy korowej – technika zastosowana w hodowli pęcherzyków pierwotnych (40). We wszystkich systemach, z wyjątkiem hodowli w mikrokroplach, stosuje się większe objętości pożywki, którą podmienia się co 3-4 dni, natomiast hodowla w mikrokroplach wymaga częstszej wymiany pożywki, co zapobiega gromadzeniu się metabolitów, szczególnie jonów amonowych, które mogłyby mieć toksyczne oddziaływanie na rosnące pęcherzyki. Takie substraty stosowane w hodowli pęcherzyków jak kolagen i fibronektyna są głównymi komponentami pozakomórkowej tkanki łącznej (41), natomiast laminina jest glikoproteidem, obecnym w błonach podstawnych (42). Spełniają one funkcję białek wiążących, których zadaniem jest ochrona przed utratą pęcherzyków z hodowli, np. w czasie wymiany pożywki, zachowanie trójwymiarowości komórek, a tym samym integralności pęcherzyka, wspomaganie procesów metabolicznych, tj. dostępności związków odżywczych z pożywki i wymiany gazowej. Mankament hodowli z użyciem białek wiążących stanowi trudność uwolnienia pęcherzyków czy oocytów po zakończeniu hodowli i wynikająca stąd konieczność użycia enzymów, np. kolagenazy.

Pęcherzyki przedantralne o średnicy $> 150 \mu\text{m}$, zarówno mysie (30,39) jak i bydlęce (31-34) można z powodzeniem hodować bez obecności białek wiążących, w mikrokroplach pożywki. Hodowane w tych warunkach pęcherzyki mysie mogą owulować *in vitro* (30), natomiast bydlęce mogą osiągać stadium antralne i przeżywać w hodowli nawet około 3 tygodni (fot. 1). Wspomniano już, że techniki hodowli pęcherzyków zostały w stosunkowo szerokim zakresie opanowane jedynie u gryzoni, a przede wszystkim u myszy. Wynika to z czasu rozwoju pęcherzyka od momentu zapoczątkowania wzrostu aż do osiągnięcia stadium przedowulacyjnego, który trwa u tego gatunku 21 dni, podczas gdy np. u bydła wzrost pęcherzyka pierwotnego do stadium przedowulacyjnego następuje w czasie od 80 do 100 dni (43,44).

W prowadzonych przez Kątską i wsp. (31-34) badaniach z zakresu hodowli bydlęcych pęcherzyków przedantralnych i wczesnoantralnych wykazano, że czas przeżywania pęcherzyków *in vitro* zależy od ich początkowej wielkości. Najdłuższy okres wzrostu wykazywały pęcherzyki o średnicy od 275 do 324 μm . Zwiększenie średnicy pęcherzyka w efekcie hodowli, niezależnie od rodzaju użytej pożywki, nie przekraczało 73% początkowej wielkości pęcherzyka. Nie stwierdzono istotnych różnic we wzroście pęcherzyków różnych klas wielkości, czy też w zależności od rodzaju użytej pożywki. Stwierdzono natomiast korzystny wpływ na wzrost pęcherzyków



Fot. 1. Pęcherzyk wczesnoantralny po 11 dniach hodowli w mikrokropeli pożywki (pow. $\times 80$).

dotychczasowych uzupełnień pożywki związkami energetycznymi, hormonami i czynnikami wzrostu (33,36,45,46). Wykazano szczególnie korzystny wpływ FSH na rozwój pęcherzyków przedantralnych w hodowli *in vitro*. Stwierdzono, że FSH przyspiesza proliferację i różnicowanie komórek ziarnistych, a także zapobiega ich apoptozie (35,45-47). Ponadto, insulina, transferyna, selen, glutamina i pirogronian sodu znacznie przyspieszają proliferację komórek ziarnistych. Potwierdzeniem tego wniosku jest wykazanie przeszło dwukrotnie wyższego odsetka wzrostu i czasu przeżywania pęcherzyków hodowanych w pożywce wzbogaconej tymi składnikami w porównaniu z grupą kontrolną (33).

4. Ocena wzrostu i kompetencji rozwojowych oocytów

Średnica zarówno pęcherzyka jak i oocytu bydlęcego wzrasta stopniowo w miarę przedłużania czasu hodowli. Najistotniejszym kryterium oceny hodowanych *in vitro* pęcherzyków przedantralnych i/lub wczesnoantralnych jest stan morfologiczny oocytów izolowanych z nich po ukończeniu hodowli, a także zdolności rozwojowe tych oocytów. Wandji i wsp. (40) obserwowali występowanie masowej degeneracji oocytów w bydlęcych pęcherzykach przedantralnych hodowanych przez 5 do 6 dni, mimo że stwierdzano w tych pęcherzykach proliferację komórek ziarnistych i aktywność sekrecyjną. W przeprowadzonych przez nas badaniach (34) konfiguracji chromatyny jądrowej oocytów uzyskanych ze świeżych i hodowanych *in vitro* przedantralnych i wczesnoantralnych bydlęcych pęcherzyków jajnikowych wykazaliśmy, że w hodowli pęcherzyków trwającej do 14 dni większość zawartych w nich oocytów pozostaje w stadium GV. Nie stwierdzono istotnych różnic w częstotliwości występowania oocytów w stadium GV, gdy oceniano je bezpośrednio po uzyskaniu

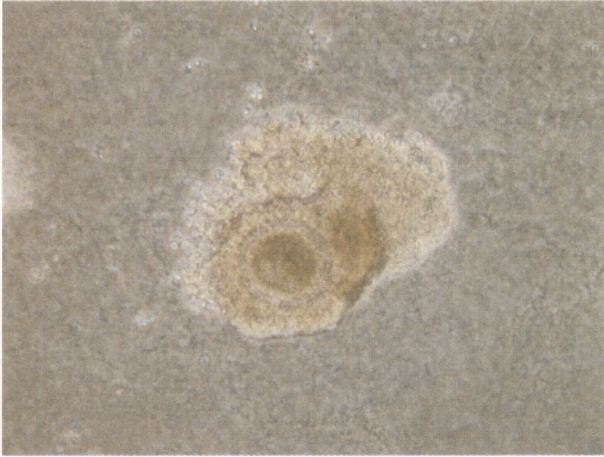
(69,4%) lub po hodowli trwającej 6, 8, 11 i 14 dni (odpowiednio 54,3; 56,4; 65,9 i 70,5%). Natomiast przedłużenie okresu hodowli do siedemnastu dni powodowało spadek odsetka oocytów w stadium GV do 25,6%, wzrost odsetka oocytów wykazujących przedwczesne zapoczątkowanie mejozy (GVBD; 39,5%) i degenerację (37,2%).

Kolejnym kryterium oceny jakości oocytów jest ich zdolność do osiągnięcia dojrzałości po ukończeniu okresu wzrostu w pęcherzyku. We wstępnych wynikach dotychczasowych badań (Kątska-Książkiewicz i Alm, dane nie opublikowane) ustalono, że tylko nieliczne oocyty uzyskane z hodowli pęcherzyków o wyjściowej wielkości, nie przekraczającej 400 μm mogą uzyskać zdolność do dojrzewania *in vitro*. Można to osiągnąć hodując pęcherzyki przez 14 dni, a następnie izolowane z tych pęcherzyków oocyty hodować w pożywce do dojrzewania przez kolejne 24 godz.

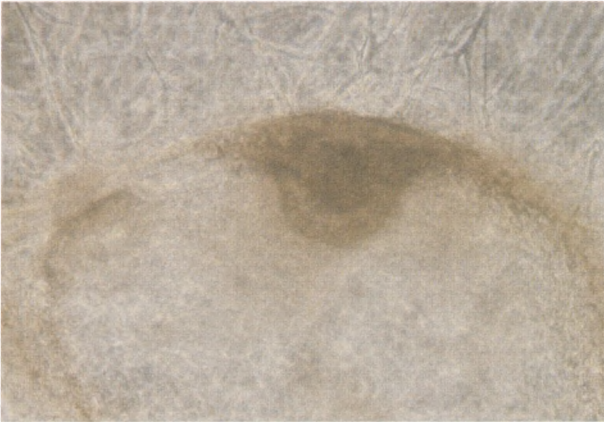
Bardziej obiecująca okazała się 14-dniowa hodowla kompleksów oocytu z komórkami wzgórka jajonośnego oraz ze ściennymi komórkami ziarnistymi, które pobierano z małych pęcherzyków antralnych o średnicy od 500 do 700 μm i zatapiano w żelu kolagenowym. Po 14-dniowej hodowli oocyty uwalniano z żelu i umieszczano w pożywce do dojrzewania na ok. 24 godz., a następnie zapładniano *in vitro* i uzyskane zarodki hodowano aż do stadium blastocysty (48). Technika ta wymaga niezwykle starannej selekcji kompleksów przeznaczanych do hodowli, a co się z tym wiąże, dużego doświadczenia operatora. W efekcie zastosowania tej procedury Yamamoto i wsp. uzyskali w 1999 r. (48) pierwsze cielę, które rozwinęło się z tak uzyskanego zarodka. Chociaż efektywność metody wynosiła zaledwie ok. od 2 do 4% są to obiecujące rezultaty.

W przeprowadzonych przez nas doświadczeniach (49) nad określeniem zdolności do dojrzewania oocytów, pobieranych z małych antralnych pęcherzyków, które hodowane były w warunkach zbliżonych do opisanych przez Yamamoto i wsp. (48), tzn. kompleksy oocyt z komórkami wzgórka jajonośnego i ściennymi komórkami ziarnistymi zatapiano w żelu kolagenowym (fot. 2 i 3) i hodowano przez 7 do 10 dni, tylko 26,5% oocytów charakteryzowało się prawidłową morfologią. Wówczas gdy takie oocyty poddaliśmy procesowi dojrzewania *in vitro*, większość zapoczątkowała proces mejozy (GVBD; 77,6%), a 27,6% osiągnęła stadium metafazy II i/lub telofazy I z wyrzuconym I ciałkiem kierunkowym. Wyniki te świadczą o możliwości uzyskiwania dojrzałych oocytów z małych pęcherzyków antralnych jednakże efektywność metody nie jest jeszcze zadowalająca.

Znaczący postęp w rozwoju metody uzyskiwania i hodowli małych pęcherzyków jajnikowych udało się ostatnio uzyskać również u świni (50). Do hodowli przeznaczano pęcherzyki o średnicy około 300 μm , które hodowano przez 4 dni, po czym uwalniano oocyty wraz z otaczającymi je komórkami pęcherzykowymi i hodowano przez kolejne 42 godz. uzyskując 51% oocytów w stadium metafazy II, z których 53% ulegało zapłodnieniu w warunkach *in vitro*, 43% zapłodnionych oocytów podejmowało rozwój zarodkowy i 13% osiągało stadium blastocysty.



Fot. 2. Kompleks oocyty z komórkami wzgórka jajonośnego i ściennymi komórkami ziarnistymi wczesnoantralnego pęcherzyka izolowany do hodowli w żelu kolagenowym ($\times 100$).



Fot. 3. Odbudowany „pęcherzyk” z kompleksu przedstawionego na fotografii 2, powstały po 5 dniach hodowli w żelu kolagenowym ($\times 100$).

5. Podsumowanie

Dotychczasowe osiągnięcia z zakresu hodowli małych pęcherzyków jajnikowych u zwierząt gospodarskich dalekie są jeszcze od zadowalających rezultatów. Nie opracowano dotychczas efektywnej metody hodowli pęcherzyków przedantralnych prowadzącej do uzyskiwania dojrzałych oocytów. Postęp, jaki udało się uzyskać dotyczył opracowania metody hodowli wczesnoantralnych (świnie) lub małych antralnych (bydło) pęcherzyków jajnikowych. Niemniej jednak dotychczasowe wyniki zachęcają do kontynuacji badań, rokując dalszy postęp w omawianym zakresie. Meto-

da hodowli pęcherzyków wczesnych stadiów rozwojowych w połączeniu z technikami już stosunkowo dobrze opanowanymi, tj. kompleksową metodą pozaustrojowej produkcji zarodków, pozwalałaby na dużo większe niż obecnie wykorzystanie potencjału gametotwórczego jajników, stając się źródłem dużej liczby gamet czy zarodków. Jest to istotne zarówno dla praktyki hodowlanej jak też dla rozwoju biotechnologii rozrodu zwierząt.

Literatura

1. Mariana J. C., Nguyen Huy N., (1973), *Ann. Biol. Anim. Bioch. Biophys.*, 13, 211-221.
2. Marion G. B., Gier H. B., Choudary J. B., (1968), *J. Anim. Sci.*, 27, 451-465.
3. Carroll J., Whittingham D. G., Wood M. J., Telfer E., Gosden R. G., (1990), *J. Reprod. Fert.*, 90, 321-327.
4. Saumande J., (1991), *Rec. Vét.*, 167, 205-218.
5. Hirshfield A. N., (1991), *Int. Rev. Cytol.*, 124, 43-101.
6. Erickson B. H., (1966), *J. Anim. Sci.*, 25, 800-805.
7. Miamura M., Kuwayama M., Hamawaki A., Eguchil Y., (1996), *Theriogenology*, 45, 300 abstr.
8. Grob H. S., (1964), *Science*, 146, 73-74.
9. Eppig J. J., Schoeder A. C., (1989), *Biol. Reprod.*, 41, 268-276.
10. Eppig J. J., O'Brien M. J., (1996), *Biol. Reprod.*, 54, 197-207.
11. Carroll J., Whittingham D. G., Wood M. J., (1991), *J. Reprod. Fert.*, 92, 197-207.
12. Carroll J., Whittingham D. G., Wood M. J., (1991), *J. Reprod. Fert.*, 93, 71-79.
13. Eppig J. J., (1976), *J. Exp. Zool.*, 198, 375-382.
14. Eppig J. J., (1977), *Dev. Biol.*, 60, 371-378.
15. Telfer E. E., Torrance C., Gosden R. G., (1990), *J. Reprod. Fert.*, 89, 555-561.
16. Daniel A. J., Armstrong D. T., Gore-Langton R. E., (1989), *Gamete Res.*, 24, 109-121.
17. Roy S. K., Greenwald G. S., (1985), *Biol. Reprod.*, 32, 203-215.
18. Nicosia S. V., Evangelista I., Batta S. K., (1975), *Biol. Reprod.*, 13, 423-447.
19. Hirao Y., Miyano T., Kato S., (1992), *Proc. 12th Int. Cong Anim. Reprod.*, 1, 333-335.
20. Greenwald G. S., Moor R. M., (1989), *J. Reprod. Fert.*, 87, 561-571.
21. Jewgenow K., Pitra C., (1993), *Theriogenology*, 39, 527-535.
22. Carambula S. F., Goncalves P. B. D., Figueiredo J. R., Neves J. P., E'Costa L. F. S., (1996), *Arq. Fac. Vet. UFRGS, Porto Alegre*, 24 supl, 235.
23. Roy S. K., Treacy B. J., (1993), *Fertil. Steril.*, 59, 783-790.
24. Jewgenow K., Pitra C., (1991), *Reprod. Dom. Anim.*, 26, 281-289.
25. Eppig J. J., Telfer E., (1993), *Methods in Enzymology*, 225, 77-84.
26. Figueiredo J. R., Hulshof S. C. J., van den Hurk R., Ectors F. J., Fontes R. J., Nusgens B., Bevers M. M., Beckers J. F., (1993), *Theriogenology*, 40, 789-799.
27. Figueiredo J. R., Hulshof S. C. J., Thiry M., van den Hurk R., Bevers M. M., Nusgens B., Beckers J. F., (1995), *Theriogenology*, 43, 845-858.
28. Hulshof S. C. J., (1995), *Bovine preantral follicles and their development in vitro*, PhD thesis, University of Utrecht.
29. Schotanus K., Hage W. J., Spek E. R., Bevers M. M., van den Hurk R., (1996), *Proc 13th ICAR*, P7-27 abstr.
30. Gosden R. G., Boland N. I., Spears N., Murray A. A., Chapman M., Wade J. C., Zhody N., Brown N., (1993), *Reprod. Med. Rev.*, 2, 129-152.
31. Kątska L., Ryńska B., (1996), *Proc. 12th Meeting EETA*, 150.
32. Kątska L., Ryńska B., (1997), *Folia Histochem. Cytobiol.*, 35, suppl. 2, 35 abstr.
33. Kątska L., Ryńska B., (1998), *Theriogenology*, 50, 213-222.

34. Kątska L., Alm H., Ryńska B., (2000), *Theriogenology*, 54, 247-260.
35. Ralph J. H., Wilmut J., Telfer E. E., (1995), *J. Reprod. Fert.*, 15, Abstr. Series, 6 abstr.
36. Ralph J. H., Wilmut J., Telfer E. E., (1996), *Biol. Reprod.*, 54, suppl. 1, 5 abstr.
37. Roy S. K., Greenwald G. S., (1989), *J. Reprod. Fert.*, 87, 103-114.
38. Torrance C., Telfer E. E., Gosden R. G., (1989), *J. Reprod. Fert.*, 87, 367-374.
39. Boland N. I., Humpherson P. G., Leese H. J., Gosden R. G., (1993), *Biol. Reprod.*, 48, 798-806.
40. Wandji S. A., Sršeň V., Voss A. K., Eppig J. J., Fortune J. E., (1996), *Biol. Reprod.*, 55, 942-948.
41. Kleinman H. K., Klebe R. J., Martin G. R., (1981), *J. Cell Biol.*, 88, 473-485.
42. Kleinman H. K., Cannon F. B., Laurle G. W., Hassell J. R., Aumailley M., Terranova V. P., Martin G. R., Dubols-Dalcq M., (1985), *J. Cell Biochem.*, 27, 317-325.
43. Britt J. H., (1991), *Bovine Prac.*, 24, 39-43.
44. Lussier J. P., Matton P., Dufour J. J., (1987), *J. Reprod. Fert.*, 81, 301-307.
45. Pöehland R., Stenzel V., Alm H., Kątska L., (1998), *J. Reprod. Fert.*, Abstr. Series No. 21, 8, abstr. 1.
46. Saha S., Shimizu M., Geshi M., Izaike Y., (2000), *Anim. Reprod. Sci.*, 63, 27-39.
47. Wandji S. A., Eppig J. J., Fortune J. E., (1996), *Theriogenology*, 45, 817-832.
48. Yamamoto K., Otoi T., Koyama N., Horikita N., Tachikawa S., Miyano T., (1999), *Theriogenology*, 52, 81-89.
49. Alm H., Kątska L., (2002), *Reprod. Dom. Anim.*, 37, 4, 233 abstr.
50. Wu J. I., Emery B. R., Carrell D. T., (2001), *Biol. Reprod.*, 64, 375-381.