

## Możliwości wykorzystania oocytów z małych pęcherzyków jajnikowych bydła do uzyskiwania zarodków – badania realizowane w Instytucie Zootechniki

Lucyna Kątska-Książkiewicz

*Dział Biotechnologii Rozrodu Zwierząt, Instytut Zootechniki, 32-083 Balice k. Krakowa*

W jajniku ssaka znajdują się tysiące niedojrzałych oocytów zawartych w małych, nie rosnących pęcherzykach pierwotnych i w pęcherzykach rosnących: przedantralnych i antralnych. Mimo ogromnych możliwości gametotwórczych jajnika ich wykorzystanie można uznać za znikome, o czym świadczy niska, w porównaniu z innymi gromadami zwierząt, rozrodczość samic. To stwierdzenie dotyczy zwłaszcza zwierząt gospodarskich, a szczególnie bydła, gdyż samica tego gatunku rodzi średnio w ciągu życia tylko 4 do 6 cieląt.

W jajniku ssaka następuje ciągły wzrost i rozwój pęcherzyków, jednakże znakomita ich większość oraz zawartych w nich oocytów (ponad 99,9%) ginie w procesie atrezji. Znikomy odsetek pęcherzyków, wynoszący zaledwie 0,05%, rozwija się do owulacji, dostarczając dojrzałe, zdolne do zapłodnienia komórki jajowe (Erickson, 1966; Saumande, 1991). Z uwagi na te uwarunkowania, opracowanie metod pozwalających na wykorzystanie tej ogromnej liczby oocytów zawartych w małych pęcherzykach jajnikowych poprzez uzyskiwanie bardzo wczesnych stadiów rozwojowych pęcherzyka i długotrwałą hodowlę *in vitro* byłoby uzasadnionym przedsięwzięciem o znaczeniu aplikacyjnym. Hodowla pęcherzyków wczesnych stadiów rozwojowych, w połączeniu z technikami już stosunkowo dobrze opanowanymi, tj. kompleksową metodą pozaustrojowej produkcji zarodków, pozwalałaby na szersze wykorzystanie potencjału gametotwórczego jajników, stanowiąc źródło

dużej liczby gamet, zarówno dla pozaustrojowego uzyskiwania zarodków, jak i dla wielu innych metod biotechnologicznych, jak np. klonowania czy transgenezy.

Pierwsze prace nad uzyskiwaniem i hodowlą małych pęcherzyków jajnikowych przeprowadzono na myszach i szczurach, a pionierska publikacja na temat izolacji tych pęcherzyków została opublikowana przez Groba (1964). U myszy, badania nad izolacją i hodowlą pęcherzyków przedantralnych doprowadziły do opanowania metod wzrostu i dojrzewania oocytów, wzrostu pęcherzyków z utworzeniem antrum, owulacji *in vitro*, uzyskania potomstwa po zapłodnieniu *in vitro* dojrzałych *in vitro* oocytów uzyskiwanych z pęcherzyków przedantralnych, a nawet pęcherzyków pierwotnych. Omawiane techniki uzyskiwania i hodowli małych pęcherzyków jajnikowych zostały stosunkowo dobrze opanowane jedynie u gryzoni, a przede wszystkim u myszy. Wynikało to z faktu, że pełny rozwój pęcherzyka od momentu zapoczątkowania wzrostu aż do osiągnięcia stadium przedowulacyjnego trwa u tego gatunku 21 dni, czyli jest 4-, 5-krotnie krótszy niż u bydła. Postęp w hodowli pęcherzyków przedantralnych u zwierząt gospodarskich, a zwłaszcza u bydła, był niewspółmiernie skromniejszy. Badania u bydła zapoczątkowano dopiero w 1991 r. (Jewgenow i Pitra, 1991), a koncentrowały się one głównie na opracowaniu metod uzysku i wstępnych próbach hodowli *in vitro*. Szersze omówienie tych zagadnień Czytelnik znajdzie w pracach przeglądo-

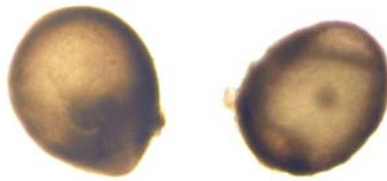
wych i monograficznych (Kątska, 1997, 2001a; Kątska i in., 2002; Kątska-Książkiewicz, 2003).

Badania zmierzające do opracowania metody długotrwałej hodowli oocytów z wczesnoantralnych pęcherzyków jajnikowych bydła zostały zapoczątkowane w Instytucie Zootechniki w 1996 r. Początkowo, tj. w latach 1996 do 1998, badania te były realizowane w projekcie autorskim KBN, a w 1998 roku zapoczątkowano w tym zakresie badań współpracę z Niemcami. Była ona możliwa dzięki umowie międzyrządowej z zakresu współpracy naukowej i naukowo-technicznej w dziedzinie rolnictwa, która realizowana jest nieprzerwanie do chwili obecnej. Krajowym koordynatorem współpracy Instytutu Zootechniki z Forschungsinstitut für die Biologie landwirtschaftlicher Nutztiere (FBN) w Dummerstorf koło Rostocku jest autorka niniejszego opracowania, natomiast funkcję koordynatora niemieckiego pełni dr Hannelore Alm. W trzech ostatnich latach (2003 do 2005) badania były finansowane z grantu zamawianego, jako zadanie badawcze pt. „Określenie warunków długotrwałej hodowli *in vitro* oocytów z wczesnoantralnych pęcherzyków jajnikowych bydła” (Kątska-Książkiewicz i Alm, 2004 a; Kątska-Książkiewicz i in., 2005 b, 2006 a).

Dorobek naukowy, obejmujący wyniki badań prowadzonych do roku 2002, tj. w pierwszym z wymienionych projektów badawczych, a także w ramach współpracy z Niemcami, obejmował dwie prace oryginalne (Kątska i Ryńska, 1998; Kątska i in., 2000), artykuł przeglądowy (Kątska, 1997), dwie monografie (Kątska, 2001 a; Kątska i in., 2002), był także prezentowany na krajowym zjeździe (Kątska, 2001 b) i pięciu międzynarodowych sympozjach (Alm i Kątska, 2002; Kątska i Ryńska, 1996, 1997; Kątska i in., 1998 a, b). Celem badań było opracowanie metod uzysku pęcherzyków przedantralnych i wczesnoantralnych z jajników bydłecych, ich ocena i klasyfikacja morfologiczna, a także długotrwała hodowla *in vitro* prowadząca do wzrostu pęcherzyków i oocytów. Porównując możliwości uzysku małych pęcherzyków jajnikowych od jałówek i krów, stwierdzono podobne liczby pęcherzyków poszczególnych klas wielkości. Najczęściej izolowane pęcherzyki posiadały średnicę od 125 do 274  $\mu\text{m}$  i stanowiły odpowiednio 68 i 75% całkowitej populacji izolowanych pęcherzyków jajnikowych jałówek i krów (Kątska

i Ryńska, 1996, 1997, 1998). Wykazano, że czas przeżywania pęcherzyków *in vitro* zależy od ich wielkości przed rozpoczęciem hodowli. Najdłuższy okres wzrostu wykazywały pęcherzyki o średnicy 275 do 324  $\mu\text{m}$  (Kątska i Ryńska, 1996, 1997, 1998). Wzrost średnicy hodowanego pęcherzyka, niezależnie od rodzaju użytej pożywki, nie przekraczał 73% jego wyjściowej wielkości (Kątska i Ryńska, 1998). Nie stwierdzono istotnych różnic we wzroście pęcherzyków zakwalifikowanych do różnych klas wielkości, czy też w zależności od rodzaju użytej pożywki. Stwierdzono natomiast korzystny wpływ na wzrost pęcherzyków dodatkowych uzupełnień pożywki związkami energetycznymi, hormonami i czynnikami wzrostu (Kątska i Ryńska, 1998). Wyniki naszych badań (Poehland i in., 1998), a także innych autorów (Ralph i in., 1995, 1996; Saha i in., 2000; Wandji i in., 1996) wskazywały, że szczególnie korzystny wpływ na rozwój pęcherzyków przedantralnych w hodowli *in vitro* wywiera dodatek hormonu stymulującego wzrost pęcherzyków – FSH, przyspieszając proliferację i różnicowanie komórek ziarnistych, a także zapobiegając ich apoptozie. Ponadto, insulina, transferyna, selen, glutamina i pirogromian sodu znacznie przyspieszały proliferację komórek ziarnistych. Potwierdzeniem tego wniosku było wykazanie przeszło dwukrotnie wyższego odsetka wzrostu i czasu przeżywania pęcherzyków hodowanych w pożywce wzbogaczonej tymi składnikami w porównaniu z kontrolą (Kątska i Ryńska, 1998).

Stwierdzono również, że średnica zarówno pęcherzyka, jak i oocytu bydłeczego, wzrasta stopniowo w miarę przedłużania okresu hodowli, a niektóre pęcherzyki mogą przeżyć w hodowli nawet do 3 tygodni (Kątska i Ryńska, 1998). Najbardziej istotnym kryterium oceny hodowli *in vitro* pęcherzyków jest stan morfologiczny oocytów izolowanych z nich po ukończeniu hodowli, a także kompetencje rozwojowe tych oocytów. Wandji i in. (1996) obserwowali występowanie masowej degeneracji oocytów w bydłeczych pęcherzykach przedantralnych hodowanych 5 do 6 dni, mimo że stwierdzano w tych pęcherzykach proliferację komórek ziarnistych i aktywność sekrecyjną. Prowadzone w naszych badaniach analizy konfiguracji chromatyny jądrowej oocytów uzyskanych ze świeżych, tzn. nie hodowanych, a także hodowanych



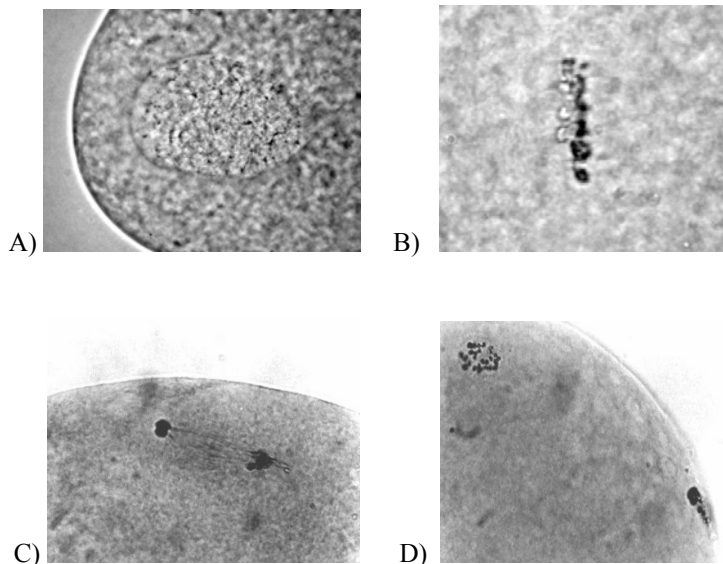
Wczesnoantralne pęcherzyki jajnikowe izolowane z jajników bydłych, przeznaczone do hodowli *in vitro*  
(mikroskop stereoskopowy, pow. 40 x)

*Early antral ovarian follicles isolated from bovine ovaries for in vitro culture*  
(stereoscopic microscope, 40 x magnification)



Kompleks oocyt-komórki wzgórka jajonośnego, uwalniany z pęcherzyka wczesnoantralnego po 14 dniach  
hodowli *in vitro* (mikroskop stereoskopowy, pow. 40 x)

*Cumulus-oocyte complex released from early antral follicle after 14 days of in vitro culture*  
(stereoscopic microscope, 40 x magnification)



Konfiguracja chromatyny w oocytach bydłych z wczesnoantralnych pęcherzyków, rosnących, a następnie dojrzewających *in vitro*. (A) Oocyt w stadium pęcherzyka zarodkowego, w diplotenie. (B) Stadium metafazy I. (C) Stadium telofazy I. (D) Stadium metafazy II z widocznym ciałkiem kierunkowym  
(mikroskop fazowo-kontrastowy, pow. 1000 x)

*Chromatin configuration in bovine oocytes from early antral follicles, growing and then maturing in vitro.*  
(A) Germinal vesicle oocyte in diplotene. (B) Metaphase I. (C) Telophase I. (D) Metaphase II with a visible polar body (phase-contrast microscope, 1000 x magnification)

*in vitro* bydłych pęcherzyków jajnikowych (Kątska i in., 2000) wykazały, że w hodowli trwającej do 14 dni większość oocytów pozostaje w stadium pęcherzyka zarodkowego (ang. germinal vesicle – GV) i nie obserwuje się istotnych różnic w częstotliwości występowania tego stadium między oocytami ocenianymi bezpośrednio po uzyskaniu (69,4%) a hodowanymi przez 6, 8, 11 i 14 dni (odpowiednio 54,3; 56,4; 65,9 i 70,5%). Natomiast, przedłużenie okresu hodowli do 17 dni powodowało spadek odsetka oocytów w stadium GV (do 25,6%), wzrost odsetka oocytów wykazujących przedwczesne zapoczątkowanie mejozy (ang. germinal vesicle breakdown – GVBD; 39,5%) i degenerację (37,2%). Kolejnym kryterium oceny jakości oocytów jest ich zdolność do osiągnięcia dojrzałości po ukończeniu okresu wzrostu w pęcherzyku. Wstępne wyniki prowadzonych badań wykazały, że tylko nieliczne oocyty uzyskane z pęcherzyków o początkowej wielkości nie przekraczającej 400  $\mu\text{m}$  mogły uzyskać zdolność do dojrzewania *in vitro* w 24-godzinnej hodowli poprzedzonej 14-dniowym okresem wzrostu *in vitro* w pęcherzyku. Nieco bardziej obiecująca okazała się opracowana przez autorów japońskich (Yamamoto i in., 1999) 14-dniowa hodowla kompleksów oocyt + komórki wzgórka jajonośnego wraz ze ściennymi komórkami ziarnistymi (ang. cumulus-oocyte-granulosa cell complexes – COCGs), które pobierano z małych pęcherzyków antralnych o średnicy 0,5 do 0,7 mm, zatapiano w żelu kolagenowym, a następnie, po uwolnieniu z żelu umieszczano w pożywce do dojrzewania na okres około 24 godzin, po czym zapładniano *in vitro*, a uzyskane zarodki hodowano aż do stadium blastocysty. Technika ta wymaga niezwykle starannej selekcji kompleksów przeznaczanych do hodowli, a co się z tym wiąże, znacznego doświadczenia operatora. Zastosowanie tej skomplikowanej procedury pozwoliło na uzyskanie w 1999 roku pierwszego cielęcia w wyniku transplantacji rozwijającego się *in vitro* zarodka (Yamamoto i in., 1999). Niestety, efektywność metody okazała się niska, gdyż wynosiła zaledwie 2 do 4%. Niemniej, te rezultaty zachęciły nas do kontynuacji badań. Celem realizowanych przez nas badań było opracowanie metod długotrwałej hodowli oocytów z wczesnoantralnych pęcherzyków jajnikowych bydła, które pozwolą na uzyskiwanie

dojrzałych komórek jajowych, przydatnych do zapłodnienia pozaustrojowego. Dorobek naukowy, będący wynikiem tych badań, obejmuje dwie prace oryginalne (Alm i in., 2006; Kątska-Książkiewicz i Alm, 2005 a), trzy artykuły przeglądowe (Kątska-Książkiewicz, 2006; Opiela i Kątska-Książkiewicz, 2004, 2005) i dwie monografie (Kątska-Książkiewicz, 2003; Kątska-Książkiewicz i in., 2006 b), prezentowany był również na 7 krajowych i międzynarodowych sympozjach (Kątska-Książkiewicz i Alm, 2003, 2004 a, b, 2005 b, c; Kątska-Książkiewicz i in., 2005 b, 2006 a).

Do badań pozyskiwano wczesnoantralne pęcherzyki o średnicy od 300 do 700  $\mu\text{m}$  (Alm i in., 2006; Kątska-Książkiewicz i Alm, 2004 a). Wczesnoantralne pęcherzyki hodowano *in vitro* przez 7 do 14 dni, w dwóch systemach hodowli, stosując:

- 1) hodowlę całych pęcherzyków;
- 2) hodowlę kompleksów oocytów z komórkami wzgórka jajonośnego i ściennymi komórkami ziarnistymi (COCGs).

Jak wynikało z naszych badań (Kątska-Książkiewicz i Alm, 2003, 2004 a, b), hodowla izolowanych z wczesnoantralnych pęcherzyków kompleksów COCGs prowadziła do utworzenia w hodowli pęcherzykopodobnych struktur. Oocyty hodowane w takich strukturach mogły uzyskiwać kompetencję mejotyczną, a następnie dojrzewać do stadium metafazy II, przy czym uzyskiwana efektywność była około 2-krotnie wyższa w porównaniu z uzyskaną dla oocytów hodowanych w całych pęcherzykach. Jednakże, mimo uzyskania pozytywnych rezultatów hodowli izolowanych kompleksów COCGs, efektywność metody nie była zadowalająca. Można było zakładać, że głównym powodem niskiej efektywności hodowli kompleksów COCGs była utrata łączności między oocytem a otaczającymi go komórkami ziarnistymi, następująca wskutek migracji tychże komórek, co w konsekwencji powodowało zaburzenia w odżywianiu oocytów i regulacji parakrynej. Migracja komórek ziarnistych w trakcie hodowli następowała w efekcie namnażania się komórek, a jej konsekwencją była stopniowa utrata przylegających do oocytu komórek wzgórka jajonośnego, a następnie degeneracja oocytu. Wydawało się więc zasadne poszukiwanie takich nowych rozwiązań metodycznych, które pozwoliłyby na zachowanie tej

łącności, czyli zapobiegałyby migracji komórek ziarnistych w trakcie hodowli. Natomiast w przypadku hodowli całych, izolowanych pęcherzyków jajnikowych, głównym powodem zmian degeneracyjnych w pęcherzykach, a zwłaszcza w zawartych w tych pęcherzykach oocytach, może być ich niedotlenienie, spowodowane ograniczonym dostępem tlenu w hodowli tak dużych struktur. Tak więc, uznano za celowe poszukiwanie takich rozwiązań metodycznych, które pozwoliłyby na eliminację lub ograniczenie tych niekorzystnych zjawisk. Wprowadzono modyfikacje warunków hodowli w oparciu o nowe, nie stosowane dotychczas rozwiązania, porównując je z technikami stosowanymi wcześniej przez innych autorów. W hodowli wzrostowej kompleksów COCGs zastosowano więc cztery różne warianty hodowli:

- mikrodołki (ang. well of the well – WOW) wydrążane w 4-dołkowych naczynkach plastikowych (Kątska-Książkiewicz i Alm, 2005 a);
- duża objętość żelu kolagenowego, tj. 2 x 400 µl (Alm i in., 2006; Kątska-Książkiewicz i Alm, 2005 a, b, c; Kątska-Książkiewicz i in., 2005 b, 2006 a);
- mikrokrople żelu kolagenowego 2 x 5 µl (Alm i in., 2006; Kątska-Książkiewicz i Alm, 2005 a, b, c; Kątska-Książkiewicz i in., 2005 b, 2006 a);
- hodowla na specjalnych wkładkach – insertach pokrytych żelem kolagenowym, w pożywce o zwiększonej gęstości poprzez uzupełnienie 4% poliwinylpirolidyny - PVP i 5% płodowej surowicy cielęcej (Kątska-Książkiewicz i Alm, 2005 c; Kątska-Książkiewicz i in., 2006 a).

W hodowli całych pęcherzyków jajnikowych stosowano również cztery warianty hodowli:

- mikrodołki WOW (Kątska-Książkiewicz i Alm, 2005; Kątska-Książkiewicz i in., 2005 b);
- duża objętość żelu kolagenowego, tj. 2 x 400 µl (Alm i in., 2006; Kątska-Książkiewicz i Alm, 2005 a, b; Kątska-Książkiewicz i in., 2005 b, 2006 a);
- mikrokrople żelu kolagenowego 2 x 5 µl (Alm i in., 2006; Kątska-Książkiewicz i Alm, 2005 a, b, c; Kątska-Książkiewicz

i in., 2005 b, 2006 a);

- hodowla w wiszących kroplach pożywki, tzw. hodowla „odwrócona” (Kątska-Książkiewicz i Alm, 2005 a, b, c; Kątska-Książkiewicz i in., 2005 b, 2006 a).

Po ukończeniu hodowli wzrostowej oocyty o prawidłowym wyglądzie morfologicznym uwalniano bądź ze ściennych komórek ziarnistych (tworzących struktury pęcherzykopodobne) bądź z pęcherzyków, umieszczano je w pożywce do dojrzewania oocytów na okres około 24 godzin, po czym oceniano ich jakość morfologiczną oraz dojrzałość do zapłodnienia (ocena cytogenetyczna). Część dojrzałych *in vitro* oocytów, o prawidłowym wyglądzie morfologicznym, pochodzących z najbardziej efektywnych wariantów hodowli, przeznaczano do zapłodnienia *in vitro* stosując standardową procedurę kapacytacji i zapłodnienia (Kątska-Książkiewicz i in., 2005 a). Po zapłodnieniu, oocyty umieszczano w hodowli na około 24 godziny celem sprawdzenia ich zdolności do podejmowania rozwoju zarodkowego, a następnie utrwalano je w celu przeprowadzenia mikroskopowej oceny wyników zapłodnienia (Kątska-Książkiewicz i in., 2005 c; Kątska-Książkiewicz i in., 2006 a).

Stwierdzono, że oocyty rosnące w izolowanych kompleksach COCGs, umieszczanych w mikrodołkach WOW lub na insertach pokrytych żelem kolagenowym, w pożywce o zwiększonej lepkości i/lub w mikrokroplach żelu kolagenowego wykazywały podobną jakość morfologiczną, bowiem uzyskiwano około 35% oocytów przydatnych do dojrzewania *in vitro* po ukończeniu hodowli wzrostowej oraz podobną zdolność do dojrzewania *in vitro* (ok. 20% dojrzałych oocytów). Natomiast, oocyty rosnące w kompleksach COCGs zatopionych w dużej objętości żelu przeżywały znacznie krócej w hodowli wzrostowej, gdyż uzyskiwano tylko około 35% oocytów przydatnych do dalszej hodowli, tj. do dojrzewania *in vitro*. W drugim systemie hodowli, tj. w hodowli całych, izolowanych pęcherzyków, odsetek przeżywających oocytów był zdecydowanie mniejszy i stanowił: 4,8%, 8,5%, 44,0% i 39,3%, odpowiednio dla wariantów hodowli: WOW, duża objętość żelu, mikrokrople żelu i krople wiszące. Po dojrzewaniu *in vitro* tych oocytów najwyższy odsetek dojrzałych oocytów (6,8%) uzyskano z hodowli w mikro-

kroplach żelu kolagenowego.

Porównano zdolność do zapłodnienia i podejmowania rozwoju zarodkowego oocytów z wczesnoantralnych pęcherzyków, które umieszczano w hodowli w całych, izolowanych pęcherzykach zawieszanych w wiszących kroplach pożywki lub uzyskiwano kompleksy COCGs umieszczając je w hodowli wzrostowej w mikrokroplach żelu kolagenowego albo na insertach pokrytych żelem, a następnie przeprowadzano dojrzewanie i zapłodnienie *in vitro* oocytów o prawidłowym wyglądzie morfologicznym. Stwierdzono, że oocyty rosnące w izolowanych kompleksach COCGs w mikrokroplach żelu kolagenowego albo na insertach pokrytych żelem osiągały wyższą zdolność do zapłodnienia (odpowiednio 47,9% i 21,4%) oraz rozwoju zarodkowego (odpowiednio 6,7% i 8,3%) w porównaniu z oocytami rosnącymi w całych, izolowanych pęcherzykach (25,0% oocytów zapłodnionych i brak dzielących się zarodków).

Dotychczasowe badania wskazują na możliwość uzyskiwania zarodków z kompleksów COCGs izolowanych z bydłych wczesnoantralnych pęcherzyków jajnikowych, a tym samym na możliwość lepszego wykorzystania potencjału rozrodczego samicy. Opracowana przez nas nowa metoda hodowli kompleksów COCGs w mikrokroplach żelu kolagenowego pozwala na

zwiększenie odsetka oocytów przydatnych do dojrzewania i zapłodnienia *in vitro* w stosunku do standardowej metody hodowli stosowanej przez innych autorów (duża objętość żelu kolagenowego, tj. 2 x 400 µl). Uzyskanie stosunkowo wysokiego odsetka zapłodnionych oocytów, których część była zdolna do podjęcia rozwoju zarodkowego, należy uznać za osiągnięcie umożliwiające realizację zamierzonych celów badawczych, tj. szerszego wykorzystania potencjału gametotwórczego jajnika. Uzyskiwana efektywność nie jest jeszcze zadowalająca, tzn. nie pozwala na praktyczne wykorzystanie w pracach biotechnologicznych oocytów pochodzących z małych pęcherzyków. Wskazuje to na potrzebę kontynuacji badań. Badania należą niewątpliwie do trudnych, czaso- i pracochłonnych. Wymagają nie tylko znacznego doświadczenia i cierpliwości operatora, lecz również doskonałego wyposażenia laboratorium, z uwagi na konieczność prowadzenia długotrwałych hodowli, które jakże łatwo mogą ulegać różnorodnym infekcjom, niekiedy nawet po wielu dniach doświadczeń. Zapewne te ograniczenia sprawiają, że prace z tego zakresu prowadzone są tylko w nielicznych ośrodkach naukowych, głównie japońskich. W tej sytuacji jednak nasz udział w tych badaniach można uznać za cenne osiągnięcie i zamierzenie warte kontynuacji.

## Literatura

Alm H., Kątska L. (2002). Survival and meiotic competence of bovine COCs originating from early antral ovarian follicles. 6th Conf. Eur. Soc. Dom. Anim. Reprod. (ESDAR), Parm, Italy, 12-14 September 2002. Reprod. Dom. Anim., 37 (4): 223, abstr. P1. 2.

Alm H., Kątska-Książkiewicz L., Ryńska B., Tuchscherer A. (2006). Survival and meiotic competence of bovine oocytes originating from early antral ovarian follicles. Theriogenology (w druku).

Erickson B.H. (1966). Development and senescence of the postnatal bovine ovary. J. Anim. Sci., 25: 800-805.

Grob H.S. (1964). Enzymatic dissection of the mammalian ovary. Science, 156: 73-74.

Jewgenow K., Pitra C. (1991). Die Isolierung von Präantralfollikeln aus Eierstöcken des Rindes. Reprod.

Dom. Anim., 26: 281-289.

Kątska L., Ryńska B. (1996). Preliminary investigation on isolation and *in vitro* culture of bovine preantral follicles. Proc. 12th Meeting of European Embryo Transfer Association (AETE), Lyon, p. 150.

Kątska L., Ryńska B. (1997). Isolation and *in vitro* culture of ovarian preantral and early antral follicles in cattle. 2nd Symposium of Tissue Cultures of Central European Countries. Folia Histochemica et Cytophysiologia, 35 (suppl. 2): 35, P026.

Kątska L. (1997). Izolacja i hodowla *in vitro* bydłych pęcherzyków jajnikowych. Med. Wet., 53 (7): 387-390.

Kątska L., Ryńska B. (1998). The isolation and *in vitro* culture of bovine preantral and early antral follicles of different size classes. Theriogenology, 50 (2): 213-222.

- Kątska L., Alm H., Ryńska B. (1998 a). Quality of bovine oocytes derived from fresh and *in vitro* cultured early antral follicles. Proc. Satellite Symp. I: Modern techniques in biology of reproduction. EAAP, 1998, Jastrzębiec. Anim. Sci. Pap. Rep., 16, suppl. 1: 53-54.
- Kątska L., Alm H., Ryńska B. (1998 b). Frequency of the germinal vesicle stage in the oocytes derived from fresh and *in vitro* cultured preantral bovine ovarian follicles. Proc. 2nd Conf. Eur. Soc. Dom. Anim. Rep. (ESDAR), Keszthely, Hungary, pp. 69-70.
- Kątska L., Alm H., Ryńska B. (2000). Nuclear configuration of bovine oocytes derived from fresh and *in vitro*-cultured preantral and early antral ovarian follicles. Theriogenology, 54 (2): 247-260.
- Kątska L. (2001 a). Możliwości wykorzystania potencjału gametotwórczego ssaków poprzez hodowlę *in vitro* przedantralnych i wczesnoantralnych pęcherzyków jajnikowych, Post. Biol. Kom., 28, supl.18: 171-181.
- Kątska L. (2001 b). Możliwości wykorzystania potencjału gametotwórczego ssaków poprzez hodowlę *in vitro* przedantralnych i wczesnoantralnych pęcherzyków jajnikowych. Mat. II Krajowego Zjazdu Towarzystwa Biologii Rozrodu, 4, 2, s. 52.
- Kątska L., Alm H., Kanitz W. (2002). Isolation and culture of bovine preantral and early antral follicles. A.E.T.E. NEWSLETTER N° 15, February.
- Kątska-Książkiewicz L. (2003). Dotychczasowe osiągnięcia i perspektywy hodowli przed- i wczesnoantralnych pęcherzyków jajnikowych ssaków. Biotechnologia, 1 (60): 129-137.
- Kątska-Książkiewicz L., Alm H. (2003). Developmental competence of oocytes originated from early antral ovarian follicles in cattle. Proc. 19th Scientific Meeting of the European Embryo Transfer Association (AETE), Rostock, Germany, p. 170.
- Kątska-Książkiewicz L., Alm H. (2004 a). Określenie warunków długotrwałej hodowli oocytów z wczesnoantralnych pęcherzyków jajnikowych bydła. XIII Symp. Sekcji Płodności i Niepłodności Polskiego Towarzystwa Ginekologicznego (SPIN), Zjazd Towarzystwa Biologii Rozrodu, Białowieża, 11-12 czerwca 2004 (referat wygłoszony). W: Biologia rozrodu oraz zdrowie reprodukcyjne człowieka, W. Kuczyński (ed.), Białystok, ss. 160-161.
- Kątska-Książkiewicz L., Alm H. (2004 b). Określenie warunków długotrwałej hodowli *in vitro* oocytów z wczesnoantralnych pęcherzyków jajnikowych bydła. Mat. I Sympozjum projektu badawczego zamawianego PBZ-KBN-084/PO6/2002; Uniwersytet Warmińsko-Mazurski, Olsztyn, luty 2004. W: Biotechnologiczne i fizjologiczne metody doskonalenia procesów rozrodu zwierząt w warunkach prawidłowego i zakłóconego środowiska, ss. 135-140.
- Kątska-Książkiewicz L., Alm H. (2005 a). Effect of culture methods on cumulus and oocyte morphology and meiotic competence of bovine oocytes from early antral follicles. Arch. Tierz., Dummerstorf, 48 (6): 562-571.
- Kątska-Książkiewicz L., Alm H. (2005 b). Effect of modification of growth culture of early antral ovarian follicles on survival of bovine cumulus-oocyte complexes. Sympozjum ESDAR, Murcia, Hiszpania. Reprod. Dom. Anim., 40 (4): 338-344, OC1.3.
- Kątska-Książkiewicz L., Alm H. (2005 c). Early antral bovine follicles after growth culture – oocyte survival, maturation and fertilization. Proc. 4th Symp. Soc. Biol. Reprod. and Joint Polish-Japanese Seminar, 22-24 September, TBR, Kraków, p. 44.
- Kątska-Książkiewicz L., Bochenek M., Ryńska B. (2005 a). Effect of quality of sperm chromatin structure on *in-vitro* production of cattle embryos. Arch. Tierz., Dummerstorf, 48: 32-39.
- Kątska-Książkiewicz L., Ryńska B., Wieczorek J., Opiela J., Alm H. (2005 b). Określenie warunków długotrwałej hodowli *in vitro* oocytów z wczesnoantralnych pęcherzyków jajnikowych bydła. Mat. II Sympozjum projektu badawczego zamawianego PBZ-KBN-084/PO6/2002; Uniwersytet Warmińsko-Mazurski, Olsztyn, 10-11 luty 2005. W: Biotechnologiczne i fizjologiczne metody doskonalenia procesów rozrodu zwierząt w warunkach prawidłowego i zakłóconego środowiska, ss. 155-161.
- Kątska-Książkiewicz L., Alm H., Ryńska B., Opiela J. (2006 a). Określenie warunków długotrwałej hodowli *in vitro* oocytów z wczesnoantralnych pęcherzyków jajnikowych bydła. Mat. III Sympozjum projektu badawczego zamawianego PBZ-KBN-084/PO6/2002; Uniwersytet Warmińsko-Mazurski, Olsztyn, 9-10 luty 2006. W: Biotechnologiczne i fizjologiczne metody doskonalenia procesów rozrodu zwierząt w warunkach prawidłowego i zakłóconego środowiska, ss. 151-155.
- Kątska-Książkiewicz L. (2006). Kriokonserwacja i transplantacja wycinków kory jajnika ssaków. Ginekologia Polska (w druku).
- Kątska-Książkiewicz L., Alm H., Lechniak-Cieślak

- D., Warzych E., Sosnowski J., Korwin-Kossakowska A., Sender G. (2006 b). Genetical and biotechnological methods of utilization of female reproductive potential in mammals. *Reprod. Biol.* (w druku).
- Opiela J., Kańska-Książkiewicz L. (2004). Charakterystyka zdolności rozwojowej oocytów ssaków w aspekcie zapłodnienia i rozwoju zarodkowego: I. Dojrzałość jądrowa i molekularne aspekty tej regulacji. *Biotechnologia*, 3 (66): 107-118.
- Opiela J., Kańska-Książkiewicz L. (2005). Charakterystyka zdolności rozwojowej oocytów ssaków w aspekcie zapłodnienia i rozwoju zarodkowego. II. Regulacja dojrzałości cytoplazmatycznej i genomowej. *Biotechnologia*, 2 (69): 151-162.
- Poehland R., Stenzel V., Alm H., Kańska L. (1998). The influence of FSH on viability, growth and steroid synthesis of bovine preantral follicles in different stages of differentiation *in vitro*. Summer Meeting of the Society of the Study of Reproduction (oral presentation). *J. Reprod. Fert., Abstr. Series*, 21: p. 8 (abstr. 1).
- Ralph J.H., Wilmut J., Telfer E.E. (1995). *In vitro* growth of bovine preantral follicles and the influence of FSH on follicular and oocyte diameters. *J. Reprod. Fert.*, 15 (Abstr. Series), 6 abstr.
- Ralph J.H., Wilmut J., Telfer E.E. (1996). The effects of FSH on bovine preantral to early antral ovarian follicle growth *in vitro*. *Biol. Reprod.*, 54 (suppl. 1), 5 abstr.
- Saha S., Shimizu M., Geshi M., Izaike Y. (2000). *In vitro* culture of bovine preantral follicles. *Anim. Reprod. Sci.*, 63: 27-39.
- Saumande J. (1991). La folliculogenèse chez les ruminants. *Rec. Vét.*, 167: 205-218.
- Wandji S.A., Eppig J.J., Fortune J.E. (1996). FSH and growth factors affect the growth and endocrine function *in vitro* of granulosa cells of bovine preantral follicles. *Theriogenology*, 45: 817-832.
- Yamamoto K., Otoi T., Koyama N., Horokita N., Tachikawa S., Miyano T. (1999). Development to live young from bovine small oocytes after growth, maturation and fertilization *in vitro*. *Theriogenology*, 52: 81-89.

## POSSIBILITY OF USING OOCYTES FROM SMALL OVARIAN FOLLICLES OF CATTLE FOR EMBRYO PRODUCTION – STUDIES AT THE NATIONAL RESEARCH INSTITUTE OF ANIMAL PRODUCTION

### Summary

The mammalian ovary contains thousands of immature oocytes found in small, non-growing primary follicles and in growing, preantral and antral follicles. Although the ovary has enormous gametogenic potential, their use is negligible, as evidenced by low reproductiveness of females compared to other classes of animals. Considering these factors, it would be justified to develop methods for using the huge number of oocytes found in small ovarian follicles through the production of very early developmental stages of the follicle and long-term *in vitro* culture. Culture of follicles in early developmental stages, combined with relatively well established techniques, i.e. the complex method of *in vitro* embryo production, would enable the gametogenic potential of ovaries to be used to a greater extent, providing a large number of gametes for both *in vitro* embryo collection and many other biotechnological techniques such as cloning or transgenesis. The paper presents achievements in the studies carried out at the National Research Institute of Animal Production on long-term *in vitro* culture of oocytes from small ovarian follicles of cattle.