

Ocena wpływu soli hialuronianu sodu na dojrzałość meiotyczną i fragmentacje DNA oocytów bydlęcych dojrzewających *in vitro* – wstępne wyniki badań*

Ewa Latasiewicz, Jolanta Opiela

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

Dojrzewanie oocytów *in vitro* stanowi krytyczny etap w kompleksowej technice pozaustrojowej produkcji zarodków. Dojrzałe oocyty mogą zostać wykorzystane także w innych procedurach biotechnologicznych, takich jak np. klonowanie czy otrzymywanie zwierząt transgenicznych. Podczas dojrzewania *in vitro* ponad 80% oocytów osiąga stadium metafazy II (MII). Z kolei, 70–80% w pełni dojrzałych oocytów jest zdolnych do zapłodnienia, a tylko połowa z nich rozwija się do stadium blastocysty podczas hodowli *in vitro* (Mermillod i in., 1999; Kątska-Książkiewicz i in., 2007). Jednym z czynników ograniczających zdolności rozwojowe oocytów *in vitro* może być ich nieprawidłowe dojrzewanie, spowodowane suboptymalnymi warunkami hodowli (Moor i in., 1998).

W hodowli komórek *in vitro*, ze względu na jej dwuwymiarowy charakter, wiele ważnych funkcji biologicznych nie jest odpowiednio regulowanych. Hialuronian, który w zależności od konfiguracji i stężenia tworzy w środowisku wodnym międzykomórkową, trójwymiarową, galaretowatą sieć, umożliwiającą migrację komórek, poprawia oddziaływanie między receptorami komórek a cząsteczkami środowiska zewnętrznego, między innymi poprzez lepsze wiązania polipeptydowych czynników wzrostu, pełniących ważną funkcję podczas wczesnego roz-

woju embrionalnego (Scott i in., 1991; Tian i in., 2005). Hialuronian jest głównym komponentem rozekspandowanego kompleksu oocyt-komórki wzgórka jajonośnego COCs (ang. cumulus-oocyte-complexes); jest on syntetyzowany i wydzielany przez komórki wzgórka pod wpływem stymulacji FSH i LH (Eppig, 1982). Rozekspandowany kompleks oocyt-komórki wzgórka jajonośnego ułatwia oderwanie się oocytu od ściany pęcherzyka w trakcie owulacji. Aby doszło do rozproszenia komórek wzgórka jajonośnego, konieczna jest interakcja między HA a jego receptorem CD44 (Yokoo i in., 2007), jak również modyfikacja połączeń szczelinowych zbudowanych z białek heksamerycznych, należących do rodziny koneksyn Cxs (ang. connexins). Jak wykazano, zapoczątkowanie podziału meiotycznego u klaczy, świni i szczura wiąże się z obniżeniem poziomu koneksyny 43 (Cx43) (Marchal i in., 2003). Nowsze badania (Yokoo i in., 2010) sprzeczywały, że oddziaływanie hialuronianu z jego receptorem CD44 podczas ekspansji komórek wzgórka powoduje obniżenie poziomu koneksyny 43 w wyniku fosforylacji tyrozyny w białku Cx43. Efektem tego procesu jest zablokowanie transportu cAMP pomiędzy komórkami wzgórka i oocytem. Spadek stężenia cAMP w oocycie jest sygnałem do aktywacji czynnika MPF, który jest odpowiedzialny za wznowienie podziału meiotycznego (GVBD) (Yokoo i in., 2010) (rys. 1).

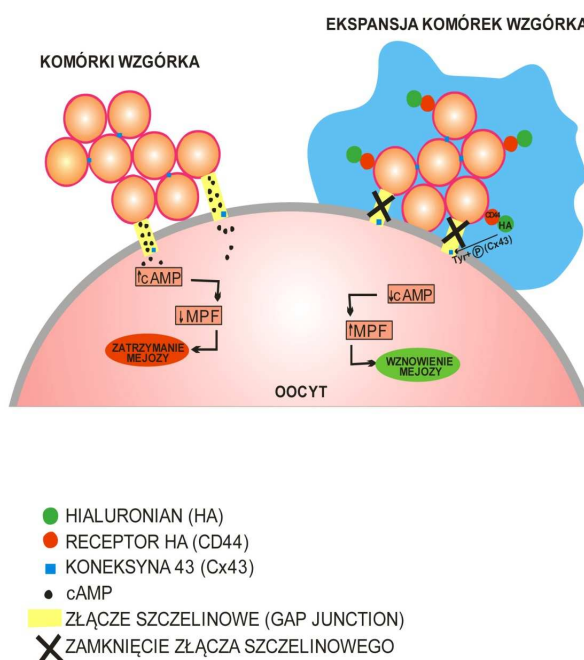
Analizując otrzymane wyniki uznano, że istnieje przesłanka, iż dodatek egzogenego HA

* Praca finansowana ze środków statutowych, temat nr 3343.1.

do hodowli oocytów *in vitro* może przyczynić się do zwiększenia odsetka oocytów osiągających dojrzałość meiotyczną, czyli stadium metafazy II.

Celem badań była zatem ocena wpływu suplementacji hialuronianu w pożywce IVM oocytów bydłęcych na ich dojrzałość meiotyczną

i jakość mierzoną poziomem fragmentacji DNA. Zakładano, że badania doprowadzą do doskonalenia składu pożywki do hodowli *in vitro* oocytów, co przyczyniłoby się do zwiększenia efektywności metody pozaustrojowego uzyskiwania zarodków bydłęcych.



Rys.1. Schemat wznowienia podziału meiotycznego (GVBD) (zmodyfikowany za Yokoo i in., 2010)
Fig. 1. Schematic representation of resumption of meiotic division (GVBD) (modified after Yokoo et al., 2010)

Materiał i metody

Materiał do badań stanowiły niedojrzałe oocyty, wyizolowane z jajników pozyskanych od jałówek i krów w rzeźni, dostarczone w termosie do laboratorium w ciągu 2–3 godzin od uboju.

Uzyskiwanie i selekcja oocytów bydłęcych według protokołu opracowanego przez Kątską (1985)

Dojrzewanie oocytów *in vitro*

Do hodowli niedojrzałych oocytów zastosowano komercyjną pożywkę TCM-199, zbuforowaną 25 mM HEPES i 26 mM wodorowęglanu sodu, uzupełnioną L-glutaminą. Po dodaniu stosownych uzupełnień – opis zamieszczony przy grupie doświadczalnej – pożywkę filtrowa-

no i umieszczano w szalkach. Niedojrzałe oocyty (30–50 sztuk) hodowano w szalkach o średnicy 3 cm (Nunc, Denmark), w 2 ml pożywki, w obecności komórek ziarnistych pęcherzyka jajnikowego.

Grupy doświadczalne:

1. **P1+GC**; dotychczas używana pożywka do dojrzewania oocytów – TCM 199, uzupełniona 20% bydlęcą surowicą rujową (ECS). Dojrzewanie prowadzono we współhodowli z komórkami ziarnistymi pęcherzyka jajnikowego. Komórki ziarniste uzyskano z pęcherzyków jajnikowych o średnicy 4–6 mm bez zmian atretycznych, zawierających oocyty o prawidłowym wyglądzie morfologicznym. Oocyty hodowane w tej po-

- żywce stanowiły grupę kontrolną;
2. **P1+GC+HA^{75ul}**; pożywka nr 1 uzupełniona 1% hialuronianem (HA) o końcowym stężeniu $3,5 \times 10^{-2}\%$;
 3. **P1+GC+HA^{150ul}**; pożywka nr 1 uzupełniona 1% hialuronianem (HA) o końcowym stężeniu $7,0 \times 10^{-2}\%$.

Kompleksy oocyty-komórki wzgórka jajonośnego we wszystkich badanych pożywkach dojrzewały *in vitro* przez 22–24 godziny, w temperaturze 39°C, w obecności 5% CO₂ w powietrzu, przy maksymalnej wilgotności.

Utrwalanie dojrzałych oocytów

Oocyty pozbawione komórek wzgórka jajonośnego zostały utrwalone w 100 µl kropli 4% roztworu paraformaldehydu w płynie PBS (pH 7,4) przez godzinę w temperaturze pokojowej. Następnie, zostały przeniesione do 100 µl kropli 1% roztworu paraformaldehydu w płynie PBS i przechowywane w temperaturze 4°C przez okres nie dłuższy niż 2 tygodnie.

Ocena jakości i dojrzałości oocytów

Analiza TUNEL

Analiza TUNEL została wykonana przy użyciu zestawu DeadEnd™ Fluorometric TUNEL System, firmy Promega. W celu wywołania permabilizacji błony komórkowej oocyty umieszczano w kropli 0,2% roztworu Triton X-100 na 5 minut. Po przepłukaniu i ekwilibracji w buforze ekwilibrującym przenoszono je do mieszaniny reakcyjnej, zawierającej bufor do ekwilibracji, mieszaninę nukleotydów oraz enzym TdT i inkubowano w temperaturze 38°C, w atmosferze 5% CO₂, przez 60 minut przy maksymalnej wilgotności. Zatrzymanie reakcji wbudowywania znakowanych fluoresceiną nukleotydów nastąpiło poprzez przepłukanie oocytów w roztworze 2 x SSC. W celu wybarwienia DNA oocyty przenoszono na szkiełko podstawowe i umieszczano w kropli roztworu VECTASHIELD + DAPI. Jako kontrola pozytywna służyły oocyty, które bezpośrednio po dojrzewaniu w płynie PBS poddano działaniu promieni UV przez 30 minut. Jako kontrola negatywna posłużyły oocyty, które umieszczono w mieszaninie reakcyjnej pozbawionej enzymu rTdT.

Preparaty analizowano pod mikroskopem fluorescencyjnym. Do wizualizacji stadium

mejozy oraz fragmentacji DNA oocytów używano dwóch filtrów:

- filtr o długości fali >460 nm, niebieska fluorescencja komórek wybarwionych DAPI,
- filtr o długości fali 520 ± 20 nm, zielona fluorescencja komórek apoptotycznych, które inkorporują do jądra dUTP skoniugowane z fluoresceiną.

Ocena dojrzałości mejotycznej

Na podstawie niebieskiej fluorescencji barwika DAPI dokonano klasyfikacji stadiów mejozy w oocytach (klasyfikacja za Warzych i in., 2007). Oceniano:

- stadium pęcherzyka zarodkowego (**GV**), charakteryzujące się różnym stopniem kondensacji chromatyny;
- stadium metafazy pierwszego podziału mejotycznego (**MI**) – chromosomy ułożone w postaci grupy rozdzielonych biwalentów;
- stadium metafazy drugiego podziału mejotycznego (**MII**) – charakteryzujące się obecnością dwóch grup chromosomów:
 - a) haploidalnego zestawu rozproszonych chromosomów,
 - b) zbitej grupy chromosomów, tworzącej pierwsze ciało kierunkowe (pb1).

Dojrzałość mejotyczną liczono jako stosunek oocytów w stadium MII do ogólnej liczby analizowanych oocytów.

Ocena fragmentacji DNA oocytów, indeks apoptotyczny

W przypadku intensywnie zielonej fluorescencji oocyt oceniany był jako TUNEL pozytywny. W przypadku braku zielonej fluorescencji – jako TUNEL negatywny. Indeks apoptotyczny został wyrażony jako stosunek oocytów apoptotycznych, wykazujących intensywnie zieloną fluorescencję, do wszystkich analizowanych oocytów z danej grupy.

Analizy statystyczne

Do obliczeń statystycznych zastosowano test Duncana. Jako statystycznie istotne uznawano różnice na poziomie $P < 0,05$ i jako wysoko istotne – różnice na poziomie $P < 0,01$.

Wyniki

Ocena dojrzałości i jakości oocytów bydłych

Oceniono 141 oocytów, które hodowano w trzech pożywkach o objętości 2 ml, w obecności komórek ziarnistych. 50 ocenianych oocytów hodowano w pożywce dotychczas stosowanej, pozbawionej hialuronianu, która służyła jako kontrola. W pozostałych dwóch pożywkach hodowano oocyty w obecności hialuronianu, o końcowym stężeniu wynoszącym odpowiednio $3,5 \times 10^{-2}\%$ i $7,0 \times 10^{-2}\%$; analizie TUNEL poddano 62 i 29 oocytów.

Najwyższą dojrzałość meiotyczną (89,6%) odnotowano w oocytach hodowanych w pożywce, w obecności komórek ziarnistych pęcherzyka jajnikowego z dodatkiem hialuronianu o końco-

wym stężeniu $7,0 \times 10^{-2}\%$ (P1+GC+HA^{150ul}; tab. 1). Niewiele mniej, bo aż 86% oocytów dojrzało w pożywce kontrolnej. Najniższą dojrzałość meiotyczną (71%) wykazały natomiast oocyty hodowane w pożywce uzupełnionej hialuronianem (P1+GC+HA^{75ul}; tab. 1), jednakże nie zaobserwowano statystycznie istotnych różnic pomiędzy dojrzałością meiotyczną oocytów hodowanych w w.w. pożywkach. W pożywce uzupełnionej HA o stężeniu końcowym $3,5 \times 10^{-2}\%$ zaobserwowano 6 oocytów w stadium GV i wartość ta jest statystycznie istotnie wyższa ($P < 0,05$) niż stwierdzona w pozostałych dwóch pożywkach (tab. 1). Ponadto, w żadnym ze 141 analizowanych oocytów dojrzewających w w.w. pożywkach nie zaobserwowano fragmentacji DNA.

Tabela 1. Wpływ zastosowanej pożywki na dojrzałość meiotyczną oocytów po 24 godzinach hodowli *in vitro*
Table 1. Effect of the medium used on meiotic maturation of oocytes after 24-h culture *in vitro*

POŻYWKA MEDIUM	N OOCYTÓW NO. OF OOCYTES	STADIUM DOJRZAŁOŚCI MEJOTYCZNEJ STAGE OF MEIOTIC MATURATION			DOJRZAŁOŚĆ MEJOTYCZNA MEIOTIC MATURITY (%)
		MI	MI	GV	
P1+GC*	50	43 ^A	7 ^A	0 ^b	86
P1+GC+HA ^{75ul}	62	44 ^A	12 ^A	6 ^a	71
P1+GC+HA ^{150ul}	29	26 ^A	3 ^A	0 ^b	89,6

* Pożywka kontrolna, dotychczas stosowana, P1 – pożywka TCM199, uzupełniona 20% surowicą rujową, GC – komórki warstwy ziarnistej pęcherzyka jajnikowego (ang. granulosa cells), HA – 1% hialuronian sodu.

Wartości w kolumnach z różnymi indeksami górnymi (a–b) wykazują różnice istotne statystycznie ($P < 0,05$).

*Control medium used to date, P1 – TCM199 medium supplemented with 20% estrous serum, GC – granulosa cells, HA – 1% sodium hyaluronate.

Values in columns with different superscripts (a–b) differ significantly ($P < 0,05$).

Tabela 2. Wpływ zastosowanej pożywki na fragmentację DNA oocytów po 24-godzinnej hodowli *in vitro*
Table 2. Effect of the medium used on DNA fragmentation of oocytes after 24-h culture *in vitro*

POŻYWKA MEDIUM	N OOCYTÓW NO. OF OOCYTES	FRAGMENTACJA DNA DNA FRAGMENTATION	INDEKS DCI ODSETEK OOCYTÓW APOPTOTYCZNYCH DEAD CELL INDEX (DCI)
P1+GC*	50	–	0
P1+GC+HA ^{75ul}	62	–	0
P1+GC+HA ^{150ul}	29	–	0

* Pożywka kontrolna, dotychczas stosowana, P1 – pożywka TCM199, uzupełniona 20% surowicą rujową, GC – komórki warstwy ziarnistej pęcherzyka jajnikowego (ang. granulosa cells), HA – 1% hialuronian sodu.

*Control medium used to date, P1 – TCM199 medium supplemented with 20% estrous serum, GC – granulosa cells, HA – 1% sodium hyaluronate.

Omówienie wyników

W zaprezentowanych doświadczeniach przeprowadzono analizę wpływu egzogenego hialuronianu, dodawanego do pożywki do dojrzewania *in vitro* oocytów bydłęcych w dwóch różnych stężeniach. Zgodnie z naszą wiedzą, nie badano dotychczas wpływu dodawania egzogenego hialuronianu na oocyty hodowane *in vitro*, oceniano jednak wpływ HA na zarodki. W hodowli blastocyst dodatek wysokocząsteczkowego hialuronianu w połączeniu z fafBSA do pożywki wpłynął pozytywnie na jakość zarodków w porównaniu do hodowanych w pożywce wyłącznie z BSA. Odnotowano zmniejszoną ekspresję genu stresu oksydacyjnego (SOX) oraz genu promującego apoptozę (Bax) (Pałasz i in., 2008). W przeprowadzonym doświadczeniu wykazano, że interakcja pomiędzy hialuronianem a surowicą rujową nie wpływa negatywnie na odsetek dojrzałych oocytów oraz ich jakość mierzoną poziomem fragmentacji DNA. Spośród wszystkich testowanych pożywek najwyższą dojrzałość mejotyczną wykazały oocyty hodowane w pożywce suplementowanej hialuronianem o najwyższym stężeniu. Jednak, oocyty dojrzewające w pożywce kontrolnej bez HA tylko nieznacznie odbiegały od hodowanych w P1+GC+HA^{150ul}. Obie pożywki osiągnęły najwyższe odsetki dojrzałych oocytów, na poziomie odpowiednio 89,6 i 88,6%. Interesujący jest fakt zaobserwowania niższego odsetka dojrzałych oocytów (71%) w pożywce uzupełnionej HA o stężeniu końcowym o połowę mniejszym ($3,5 \times 10^{-2}\%$) od zastosowanego w najlepszej pożywce. Ponadto, w pożywce tej odnotowano prawie 10% niedojrzałych oocytów w stadium GV (tab. 1). Obserwacja ta zaskakuje, gdyż niedostateczna suplementacja HA prowadzi do obniżenia odsetka dojrzałych oocytów nawet w porównaniu do oocytów dojrzewających bez hialuronianu. Możliwe, że wyjaśnienie tej sprzeczności leży w oddziaływaniu między HA a jego receptorami, gdyż wiele procesów komórkowych odbywa się za pośrednictwem receptorów powierzchniowo-komórkowych dla

hialuronianu, takich jak CD44 (ang. Cluster of Differentiation 44), RHAMM (ang. Receptor for HA-Mediated Motility), czy ICAM-1 (ang. Inter-Cellular Adhesion Molecule 1) (Knudson i in., 1996). Receptory te uczestniczą w regulacji takich funkcji komórkowych, jak wychwytywanie i degradacja hialuronianu (Knudson i in., 2002), utrzymanie homeostazy tkankowej (Knudson i Knudson, 1993), adhezja i migracja komórek (Saegusa i Okayasu, 1998), proliferacja i różnicowanie komórek, inhibicja apoptozy i odpowiedzi immunologicznej (Kaneko i in., 2000). Możliwe, że zbyt małe stężenie hialuronianu odczytywane jest przez komórkę jako impuls do jego degradacji, co z kolei w pewien sposób blokuje receptor. Nie bez znaczenia jest wykazanie przez Yokoo i in. (2007), że w wyniku hodowli oocytów w obecności przeciwciała przeciwko receptorowi CD44 następuje supresja czynnika MPF oraz zatrzymanie zaniku pęcherzyka zarodkowego. Kluczowym zdarzeniem w tym zjawisku jest oddziaływanie hialuronianu z jego głównym receptorem CD44, w wyniku czego dochodzi do zahamowania transportu cAMP poprzez połączenia szczelinowe pomiędzy komórkami wzgórką a oocytem, co jest z kolei sygnałem do aktywacji czynnika MPF i wznowienia mejozy.

Ocena fragmentacji DNA oocytów hodowanych w badanych pożywkach stanowiła istotną składową doświadczenia, gdyż zakładano, że zaobserwowanie reakcji TUNEL pozytywnej będzie świadczyć o szkodliwym wpływie soli hialuronianu na oocyt. Nie stwierdzono fragmentacji DNA, dlatego można wnioskować, że HA nie ma działania proapoptotycznego na oocyty.

Reasumując, prezentowane wyniki dowodzą, że hialuronian nie wykazuje szkodliwego działania na jakość oocytów mierzoną poziomem fragmentacji DNA oraz na odsetek oocytów osiągających stadium metafazy II, dlatego celowe jest kontynuowanie prac, mających na celu weryfikację przydatności dodawania HA do pożywki IVM poprzez zapładnianie tak dojrzewających oocytów i hodowle uzyskanych zarodków do stadium blastocysty.

Literatura

- Eppig J.J. (1982). The relationship between cumulus cell-oocyte coupling, oocyte meiotic maturation and cumulus expansion. *Dev. Biol.*, 89: 268–272.
- Kaneko T., Saito H., Toya M., Saito T., Nakahara K., Hiroi M. (2000). Hyaluronic acid inhibits apoptosis in granulosa cells via CD44. *J. Assist. Reprod. Genet.*, 17: 162–167.
- Katska-Książkiewicz L., Opiela J., Ryńska B. (2007). Effects of oocyte quality, semen donor and embryo co-culture system on the efficiency of blastocyst production in goats. *Theriogenology*. 68: 736–744.
- Knudson C.B., Knudson W. (1993). Hyaluronan-binding proteins in development tissue homeostasis and disease. *FASEB J.*, 7: 1233–1241.
- Knudson W., Aguiar D.J., Hua Q., Knudson C.B. (1996). CD44-anchored hyaluronan-rich pericellular matrices: an ultrastructural and biochemical analysis. *Exp. Cell Res.*, 228: 216–228.
- Knudson W., Chow G., Knudson C.B. (2002). CD44-mediated uptake and degradation of hyaluronan. *Matrix Biol.*, 21: 15–23.
- Marchal R., Caillaud M., Martoriati A., Gerard N., Mermillod P., Goudet G. (2003). Effect of growth hormone (GH) on *in vitro* nuclear and cytoplasmic oocyte maturation, cumulus expansion, hyaluronan synthases and connexions 32 and 43 expression, and GH receptor messenger RNA expression in equine and porcine species. *Biol. Reprod.*, 69: 1013–1022.
- Mermillod P., Oussaid B., Cognié Y. (1999). Aspects of follicular and oocyte maturation that affect the developmental potential of embryos. *J. Reprod. Fertil. (Suppl.)*, 54: 449–460.
- Moor R.M., Dai Y., Lee C., Fulka J. Jr. (1998). Oocyte maturation and embryonic failure. *Hum. Reprod. Update*, 4: 223–236.
- Pałasz A.T., Breña P.B., Martinez M.F., Perez-Garnelo S.S., Ramirez M.A., Gutiérrez-Adán A., Fuente J. de la (2008). Development, molecular composition and freeze tolerance of bovine embryos cultured in TCM-199 supplemented with hyaluronan. *Zygote*, 16: 39–47.
- Saegusa Hashimura M., Okayasu I. (1998). CD44 expression in normal, hyperplastic, and malignant endometrium. *J. Pathol.*, 184: 297–306.
- Scott J.E., Cummings C., Brass A., Chen Y. (1991). Secondary and tertiary structures of hyaluronan in aqueous solution, investigated by rotary shadowing-electron microscopy and computer simulation. Hyaluronan is a very efficient network-forming polymer. *Biochem. J.*, 274: 699–705.
- Tian W.M., Hou S.P., Ma J., Zhang C.L., Xu Q.Y., Lee I.S., Li H.D., Spector M., Cui F.Z (2005). Hyaluronic acid-poly-D-lysine-based three-dimensional hydrogel for traumatic brain injury. *Tissue Eng.*, 11: 513–525.
- Warzych E., Peippo J., Szydlowski M., Lechniak D. (2007). Supplements to *in vitro* maturation media affect the production of bovine blastocysts and their apoptotic index but not the proportions of matured and apoptotic oocytes. *Anim. Reprod. Sci.*, 97: 334–343.
- Yokoo M., Shimizu T., Kimura N., Tunjung W.A., Matsumoto H., Abe H., Sasada H., Rodriguez-Martinez H., Sato E. (2007). Role of the hyaluronan receptor CD44 during porcine oocyte maturation. *J. Reprod. Dev.*, 53: 263–270.
- Yokoo M., Kimura N., Sato E. (2010). Induction of oocyte maturation by hyaluronan-CD44 interaction in pigs. *J. Reprod. Dev.*, 56: 15–19.



EVALUATION OF THE EFFECT OF SODIUM HYALURONATE ON MEIOTIC MATURATION AND DNA FRAGMENTATION OF BOVINE OOCYTES MATURING *IN VITRO* – PRELIMINARY RESEARCH RESULTS

Summary

The aim of the study was to evaluate the effect of hyaluronan (HA) supplementation of *in vitro* maturation medium on meiotic maturation and quality of bovine oocytes measured by the level of DNA fragmentation. To our knowledge, this is the first attempt that has been made to mature oocyte *in vitro* in the presence of exogenous hyaluronan. Cumulus-oocyte complexes (COCs) were matured *in vitro* in three media: in the presence of 20% estrus calf serum in co-culture with granulosa cells; in medium with addition of hyaluronan with final concentration of $7.0 \times 10^{-2}\%$; in medium with addition of hyaluronan with final concentration of $3.5 \times 10^{-2}\%$. To evaluate the meiotic maturation and DNA fragmentation of oocytes, TUNEL analysis was used. The highest meiotic maturation (90%) was observed in oocytes cultured in medium supplemented with hyaluronan with final concentration of $7.0 \times 10^{-2}\%$. The lowest meiotic maturation (71%) was observed in oocytes cultured in medium supplemented with hyaluronan with final concentration of $3.5 \times 10^{-2}\%$, but no statistical differences were found between oocytes matured in all analysed media. The chromatin quality was not affected in any of the analysed oocytes. In conclusion, the present study showed that hyaluronan supplementation does not have a detrimental effect on oocytes as shown by maturation rates and chromatin integrity; therefore, such cultured oocytes can be subjected to *in vitro* fertilization and embryo culture to definitively estimate the utility of HA supplementation.



Buhaje opasowe w typie Limousine
Limousin-type fattening bulls (fot. B. Borys)