

# Wybrane aspekty związane z dojrzewaniem oocytów, zapłodnieniem oraz rozwojem zarodkowym u psów

DOROTA BUKOWSKA, BARTOSZ KEMPISTY\*, PAWEŁ ANTOSIK,  
JĘDRZEJ M. JAŚKOWSKI, JAN OLECHNOWICZ

Katedra Weterynarii Rolniczej Wydziału Hodowli i Biologii Zwierząt AR, ul. Wojska Polskiego 52, 61-625 Poznań

\*Katedra i Zakład Biochemii i Biologii Molekularnej Wydziału Lekarskiego I UM, ul. Świącickiego 6, 60-781 Poznań

Bukowska D., Kempisty B., Antosik P., Jaśkowski J. M., Olechnowicz J.

## Selected aspects of canine oocytes maturation, fertilization and embryo development in dogs

### Summary

The development of assisted reproductive techniques in dogs creates new possibilities to protect many species from extinction. The efficiency of oocytes maturation in bitches *in vitro* is much lower in comparison to other mammals. That is why there are many limitations in the development of methods of reproduction biotechnology in this species, i.e. embryo production (IVP), cryopreservation of semen or the transfer of nuclei. The oocytes of bitches existing in the follicle environment are influenced by the activity of progesterone, while the re-start and finish of the meiotic division in these cells takes place in the uterine tube. In contrast to bitches, in the case of the majority of mammals estrogens are dominating hormones and ovulating oocytes are in metaphase II of meiotic division. Differences in the process of oocytes maturation between several species of mammals make it impossible to create optimal and at the same time universal conditions of *in vitro* production. A relatively late implantation of the embryo in dogs can also be observed. In the present article questions connected with the process of *in vivo* and *in vitro* oocytes maturation were described as well as the fertilization and initial stages of embryo development in dogs.

**Keywords:** oocyte, embryo, dog

Procesy dojrzewania oocytów (owocytów) w warunkach *in vitro* (IVM) oraz zapłodnienia (IVF) są w przypadku psów znacznie słabiej poznane w porównaniu do pozostałych gatunków ssaków. Dojrzewanie oocytów *in vitro* jest złożonym procesem dotyczącym zarówno komórek jajowych, jak i somatycznych komórek wzgórka jajonośnego. Proces ten regulowany jest przez ekspresję wielu genów, których produkty białkowe katalizują ważne dla rozwoju szlaki metaboliczne. W optymalnych warunkach jedynie 20% oocytów osiąga dojrzałość molekularną (4, 11). Pełna dojrzałość jądrowa jest jednym z etapów procesu składającego się na uzyskanie przez oocyty zdolności do zapłodnienia oraz prawidłowego rozwoju zarodka. Drugim etapem jest dojrzewanie cytoplazmatyczne, którego skutkiem jest formowanie przedjądrzy tuż po zapłodnieniu oraz ilościowe i jakościowe zmiany kompartmentów cytoplazmy (13). Oocyty psów nabywają zdolności rozwojowej poprzez pobieranie substancji odżywczych ze środowiska wewnątrz- i zewnątrzpęcherzykowego (jajowodowego). Ultrastrukturalne zmiany oocytów na etapie ich wczesnego rozwoju są wspólne dla większości gatunków ssaków (26). Jednak w miarę uzyskiwania przez te komórki pełnej doj-

rzałości jądrowej oraz cytoplazmatycznej zarysowują się znaczne różnice gatunkowe. Różnice te przejawiają się, między innymi, w dużej ilości tłuszczów zgromadzonych w pęcherzyku żółtkowym, które nadają oocytom ciemne zabarwienie (26). Podczas wewnątrzpęcherzykowego wzrostu oocytów następuje znaczne zwiększenie aktywności transkrypcyjnej. Wzrost syntezy RNA oraz białek jest niezbędny do regulacji cytoplazmatycznego dojrzewania oocytów. Istotną rolę w tym procesie odgrywają również połączenia typu gap junction, które umożliwiają wymianę jonów ( $\text{Ca}^{2+}$ ) oraz niewielkich cząsteczek regulatorowych (cAMP) pomiędzy komórką jajową a komórkami wzgórka jajonośnego (7, 25). Sugeruje się, że uzyskanie fizycznego kontaktu pomiędzy komórkami somatycznymi a oocytem jest warunkiem wstępnym dla wznowienia oraz zatrzymania podziału mejotycznego (22).

Uważa się, że kluczowym elementem w poznaniu mechanizmów kierujących rozrodem psów będzie stworzenie optymalnych warunków do wzrostu i dojrzewania kompleksów oocyt-wzgórek jajonośny (COC) oraz uzyskanie wysokiego potencjału rozwojowego zarodków. Modyfikacje te polegają na utrzymywaniu oocytów w warunkach *in vitro* w obecności

różnych substancji wpływających na ekspresję wybranych genów oraz tym samym regulujących ważne szlaki metaboliczne.

### Regulacja dojrzewania oocytów *in vivo*

Proces dojrzewania oocytów *in vivo* regulowany jest przez syntezę i aktywację szeregu czynników. Należą do nich czynniki wydzielane przez jajniki (30). U ssaków wzrost pęcherzykowy jest regulowany głównie poprzez hormony gonadotropowe oraz steroidowe. U suk stężenie FSH w surowicy krwi wynosi około 100 ng/ml w fazie przedrujowej (*proestrus*) i zwiększa się podczas sekrecji LH poprzedzającej owulację (3). Podczas fazy przedrujowej (*proestrus*) stężenie LH jest bardzo niskie i zwiększa się do 8-50 ng/ml na 1 do 2 dni przed jajczkowaniem. Stężenie estradiolu jest różne w poszczególnych fazach cyklu. Podczas późnego *proestrus* bądź wczesnej fazy rujowej (*oestrus*) jego stężenie wynosi 11-50 pg/ml. W fazie rujowej, poziom estradiolu w surowicy obniża się w związku ze zwiększoną sekrecją progesteronu, którego stężenie rośnie od 0,8 ng/ml we wczesnym *proestrus* do > 1 ng/ml przed jajczkowaniem (3). Wzrost pęcherzyków jajnikowych u suk różni się pod kilkoma względami od analogicznego procesu u samic innych gatunków zwierząt domowych. Wzrost stężenia LH w komórkach ziarnistych, poprzedzający jajczkowanie prowadzi do ekspozycji oocytów na wysokie stężenie progesteronu. Stężenie progesteronu w płynie pęcherzykowym, po przedowulacyjnym wzroście LH do stężenia > 7 ng/ml, wynosi około 7700 ng/ml. Jednak jego koncentracja w płynie jajowodowym, w fazie uzyskania przez oocyty pełnej dojrzałości jest zazwyczaj niższa (29).

Podczas zahamowanej sekrecji progesteronu estradiol reguluje funkcję komórek wydzielniczych, w których odbywa się synteza i sekrecja wysokocząsteczkowych glikoprotein zależnych od estrogenów. Białka te są wydzielane do światła jajowodu podczas owulacji, zapłodnienia oraz początkowych stadiów rozwoju zarodkowego (28). Obecność mRNA dla jajowodowej glikoproteiny wykazano we wszystkich trzech odcinkach jajowodu suki. Ponadto udowodniono, że białko to wykazuje dużą homologię w odniesieniu do innych gatunków ssaków (28). Sugeruje się, że ulega ono interakcji z plemnikami, wpływając na ich ruchliwość, kapacytację oraz zdolność do penetracji osłonki przejrzystej komórki jajowej (28).

Wszystkie czynniki, które docierają do oocytów wpływają na osiągnięcie przez te komórki pełnej dojrzałości jądrowej i cytoplazmatycznej. Proces dojrzewania jądrowego jest regulowany poprzez sekrecję LH. Hormon ten aktywuje mechanizmy komunikacji pomiędzy komórkami, modyfikuje wewnątrzkomórkowy skład jonów oraz inicjuje kaskadę transdukcji sygnałów z ich udziałem. Efektem tych zmian jest aktywacja dwóch czynników regulujących cykl komórkowy, tj. czynnika indukującego dojrzewanie (MPF –

maturation promoting factor) oraz kinazy białek aktywującej podziały komórki (MAPK – mitogen-activated protein kinase) (14). Czynniki regulujące wznowienie podziału mejotycznego w oocytach suk po owulacji oraz układy transdukcji sygnałów w kompleksach oocyt–komórki wzgórka jajonośnego (COC – cummulus–oocyte complex) są słabo poznane. Wyniki szeregu badań wskazują, że synteza MPF odbywa się w stadium zaniku pęcherzyka zarodkowego (GVBD – germinal vesicle break down) i może być związana z modyfikacją struktury chromatyny. Natomiast aktywność MAPK wykazuje wyraźną korelację z tworzeniem się struktur mikrotubulinowych (19).

### Regulacja dojrzewania oocytów *in vitro*

W przypadku dojrzewania oocytów *in vivo* kluczową rolę odgrywają białka zawarte w płynie pęcherzykowym i jajowodowym. Natomiast proces dojrzewania *in vitro* regulowany jest w dużej mierze przez odpowiednie pożywki wzbogacone o hormony, białka, substraty energetyczne oraz przeciwutleniacze.

### Pożywki hodowlane

Pożywki wykorzystywane do hodowli oocytów *in vitro* wpływają stymulująco zarówno na dojrzewanie tych komórek, jak i początkowe stadia rozwoju embrionalnego. Klasyfikacja pożywek opiera się na ich składzie chemicznym. Proste pożywki są roztworem soli fizjologicznej wzbogaconej o substancje energetyczne, tj. pirogronian, mleczan oraz glukozę. Natomiast pożywki złożone zawierają w swoim składzie aminokwasy, witaminy oraz inne substancje wpływające na metabolizm komórki (5). Najczęściej wykorzystywanymi pożywkami do hodowli oocytów suk są proste pożywki mKRB (Modified Krebs Singer Bicarbonate), SOF (Synthetic Oviductal Fluid) oraz złożone TCM 199 (18, 31). Udowodniono, że stosowanie złożonych pożywek (TCM) do hodowli oocytów *in vitro* zwiększa szybkość ich dojrzewania w porównaniu do prostych pożywek (23, 24).

### Hormony

Sekrecja hormonów poprzedzająca owulację jest niezbędna do wykształcenia zdolności oocytów do odpowiedzi na substancje wydzielane z jajowodu, stymulujące wznowienie podziału mejotycznego oraz dojrzewanie tych komórek. Dodanie hormonów gonadotropowych wydaje się konieczne do uzyskania pełnej dojrzałości. Wykazano, że FSH prowadzi do wznowienia podziału mejotycznego w warunkach *in vitro* poprzez regulację stężenia cAMP w kompleksie COC (10). Ponadto hormon ten stymuluje rozwój komórek wzgórka oraz nabywanie zdolności do podziałów mejotycznych (24). Natomiast osiągnięcie przez oocyty pełnej dojrzałości jądrowej wykazuje ujemną korelację z rozwojem komórek wzgórka jajonośnego oraz stężeniem hormonów gonadotropowych (FSH, LH), (23). Brak sekrecji FSH powoduje znie-

sienie bloku mejotycznego oraz wzrost liczby komórek osiagających stadium GVBD (18). Sugeruje się, że efekt działania FSH i LH może być wzmocniony przez dodanie do pożywki hormonów steroidowych. Uważa się, że dodatek zarówno FSH, jak i estradiolu do pożywki hodowlanej jest najbliższy środowisku fizjologicznemu oocytów oraz znacznie przyspiesza osiągnięcie przez te komórki dojrzałości (17). Płyn pęcherzykowy charakteryzuje się wysokim stężeniem progesteronu. Willingham-Rocky i wsp. (29) wykazali, że dodanie do pożywki progesteronu w stężeniach od 1 do 8000 ng/ml nie wpływa znacząco na wznowienie podziału mejotycznego oraz uzyskanie pełnej dojrzałości jądrowej oocytów suk. Zwiększenie stężenia progesteronu lub estrogenu do 1 µg/ml również nie miało istotnego wpływu na przebieg tych procesów (8).

Badania nad wpływem hormonu wzrostu na rozwój i dojrzewanie oocytów wykazały, że bydlęca somatotropina (bST-bovine somatotropin) w stężeniu 1-10 µg/ml nie miała wpływu na osiągnięcie dojrzałości jądrowej. Natomiast dodanie ludzkiej somatotropiny (hST – human somatotropin) nieznacznie zwiększało liczbę komórek jajowych osiagających stadium MII (18).

### Inne suplementy organiczne

Natychmiast po owulacji proces transkrypcji genów w oocytach zostaje zatrzymany (22). Zatrzymanie podziału mejotycznego następuje na skutek wpływu związków hamujących. Towarzyszy temu zahamowanie transkrypcji oraz wiele ultrastrukturalnych modyfikacji cytoplazmy oocytów, dzięki którym nabywają one zdolności do dalszego rozwoju. Sugeruje się, że podobny mechanizm charakteryzuje oocyty suk. Wykorzystanie analogu cAMP w postaci dibutyrylowego cyklicznego adenozymonofosforanu (dbcAMP) prowadzi do zatrzymania podziału mejotycznego. Wyniki tych badań wskazują, że wznowienie podziału mejotycznego w oocytach może być hamowane przez dodanie do pożywki dbcAMP w stężeniu od 0,5 do 10 mM. Udowodniono, że proces ten jest odwracalny. Jednak dodanie dbcAMP nie zwiększało liczby oocytów osiagających stadium MII (29).

Inną metodą polegającą na zatrzymaniu podziału mejotycznego w oocytach jest modyfikowanie ekspresji genu kodującego MPF. Wykorzystanie roskowityny (25 µM) jako specyficznego inhibitora kinaz zależnych od cyklin skutkowało zahamowaniem wznowienia podziału mejotycznego w oocytach suk (24). Liczba oocytów, które osiągnęły stadium GV (germinal vesicle) wynosiła 60% i nie różniła się od 48% komórek kontrolnych.

### Zapłodnienie *in vitro*

W warunkach *in vitro* plemniki psów zdolne są do penetracji osłonki przejrzystej komórki jajowej bez względu na stadium dojrzałości oocyty. Istnieje wiele sprzecznych dowodów odnośnie do zależności pomię-

dzy stopniem dojrzałości gamety żeńskiej a obecnością główki plemnika w cytoplazmie tej komórki. Mahi i wsp. (12) zaobserwowali obecność jądra komórkowego plemnika we wszystkich stadiach dojrzałości oocyty. Badania Yamada i wsp. (31) wykazały obecność powiększonej główki gamety męskiej w oocytach w stadium GV. Natomiast męskie przedjądrze ukształciło się jedynie w oocytach, w których uformowane było żeńskie przedjądrze. Wpływ penetracji plemnika na osiągnięcie przez oocyt stadium dojrzałości wymaga dalszych badań. Niektórzy autorzy donoszą, że penetracja plemnika jest silnie związana z inicjacją podziału mejotycznego oocytów w warunkach *in vitro* (19, 20). Ponadto wykazano, że liczba zapłodnionych oocytów będących w stadium GV wynosi nie więcej niż 40%. Przytoczone wyniki badań wskazują, że w uzyskaniu przez oocyty suk pełnej dojrzałości, poza penetracją plemnika, uczestniczy wiele innych czynników.

### Rozwój zarodka

Pozyskiwanie zarodków od suk odbywa się poprzez ovariohisteroktomię pomiędzy 17. godziną a 20. dniem po owulacji (9, 16). Do 9-10 dnia po owulacji zarodki znajdują się w jajowodzie (*tuba uterina*). Po owulacji komórki ziarniste silnie przylegają do oocyty i są obecne nawet w stadium formowania przedjądrzy. Komórki pęcherzykowe zaczynają się uwalniać, a następnie zanikać pomiędzy 5.-7. dniem ciąży, to jest w okresie, w którym zarodek znajduje się w stadium od formujących się przedjądrzy do stadium 8 komórek. Niektóre spośród zarodków w stadium 8-komórkowym mogą być otoczone pojedynczą warstwą komórek wzgórka jajonośnego (1, 2).

Po zapłodnieniu zarodka w stadium uformowanych dwóch przedjądrzy można pozyskiwać z jajowodu 17-138 godzin po owulacji. Zarodki w stadium 2-komórkowym, o średnicy od 110 do 179 µm pozyskuje się między 96. a 168. godziną po owulacji. Przejście 16- i 32-komórkowych embrionów w stadium moruli lub blastocysty do macicy ma miejsce między 168. a 240. godziną po owulacji (1, 2).

Zarodki 8-komórkowe pozyskuje się pomiędzy 112. a 288. godziną po owulacji. W stadium tym dochodzi do aktywacji genomu zarodkowego (EGA – embryonic genome activation). Zarodek w stadium 8-16 komórek ma średnicę 188 do 200 µm i nadal znajduje się w jajowodzie (27). W późniejszych stadiach rozwoju zarodkowego morule (8,5.-10. dzień po owulacji) bądź wczesne blastocysty (10-12 dni po owulacji) przemieszczają się do rogów macicy. Począwszy od tego etapu, średnica zarodka gwałtownie się zwiększa: od 215-350 µm w stadium wczesnej blastocysty, poprzez powiększającą się blastocystę (500-750 µm), do 1000 µm w stadium późnej blastocysty (15). Po między stadium wczesnej a późnej blastocysty zarodek zwiększa swoje rozmiary do 2300 µm i luźno unosi się w jamie macicy. Implantacja następuje między 12.

a 17. dniem po owulacji i poprzedzona jest migracją zarodków między dwoma rogami macicy (21). Zjawisko to występuje u 48-49% suk. Pomiędzy 16. a 20. dniem po owulacji blastocysta osiąga średnicę 2500  $\mu\text{m}$  i zrzuca osłonkę przejrzystą. U suk, w odróżnieniu od samic większości gatunków ssaków, nie występują enzymy proteolityczne uczestniczące w tym procesie. Implantacja zarodka kończy się pomiędzy 18.-21. dniem po owulacji. Proces ten następuje u psa bardzo późno w odniesieniu do długości ciąży, ponieważ dopiero po upływie pierwszego jej trymestru. Na przykład u kota implantacja zarodków następuje w około 1/4 trwania ciąży, u świni 1/10, u bydła 1/16-1/18, u konia 1/12-1/8 a u człowieka w 1/40-1/10 trwania ciąży (6).

### Piśmiennictwo

1. Bysted B. V.: Activation of the embryonic genome in the dog. *Theriogenology* 2000, 53, 269.
2. Bysted B. V., Dieleman S. J., Hyttel P., Greve T.: Embryonic developmental stages in relation to the LH peak in dogs. *Reprod. Fertil. Suppl.* 2001, 57, 181-186.
3. Concannon P. W.: Reproduction in the dog and cat, [w:] Cupps P. T.: Reproduction in Domestic Animals. Academic Press Inc., San Diego 1991, 517-554.
4. Farstad W.: Current state in biotechnology in canine and feline reproduction. *Anim. Reprod. Sci.* 2000, 60-61, 375-387.
5. Gordon I.: Laboratory production of cattle embryos. Cab International, Wallingford 1994.
6. Grabiec A., Modliński J. A.: Pozyskiwanie i klasyfikacja oocytów kocich. *Medycyna Wet.* 2003, 59, 93-184.
7. Grazul-Bilska A., Reynolds L. P., Redmer D. A.: Gap junctions in the ovaries. *Biol. Reprod.* 1997, 57, 947-957.
8. Hewitt D. A., England G. C. W.: Effect of preovulatory endocrine events upon maturation of oocytes of domestic bitches. *J. Reprod. Fertil. Suppl.* 1997, 51, 83-91.
9. Holst P. A., Phemister R. D.: The prenatal development of the dog: preimplantation events. *Biol. Reprod.* 1971, 5, 194-206.
10. Knobil E., Neill J. D.: The Physiology of Reproduction. Raven Press, New York 1994.
11. Luvoni G. C., Chigioni S., Allievi E., Macis D.: Factors involved in vivo and in vitro maturation of canine oocytes. *Theriogenology* 2005, 63, 41-59.
12. Mahi C. A., Yanagimachi R.: Maturation and sperm penetration of canine ovarian oocytes in vitro. *J. Exp. Zool.* 1976, 16, 189-193.
13. Mermillod P., Oussaid B., Cognie Y.: Aspects of follicular and oocyte maturation that affect the developmental potential of embryos. *J. Reprod. Fertil. Suppl.* 1999, 54, 449-460.
14. Motlik J., Pavlok A., Kubelka M., Kalous J., Kalab P.: Interplay between CDC2 kinase and MAP kinase pathway during maturation of mammalian oocytes. *Theriogenology* 1998, 49, 461-469.
15. Renton J. P., Boyd J. S., Eckersall P. D., Ferguson J. M., Harvey M. J., Mullaney J.: Ovulation, fertilization and early embryonic development in the bitch (*Canis familiaris*). *J. Reprod. Fertil.* 1991, 93, 221-231.
16. Reynaud K., Fontbonne A., Marseloo N., Thoumire S., Chebrou M., Viaris de Lesegno C., Chastant-Maillard S.: In vivo meiotic resumption, fertilization and early embryonic development in the bitch. *Reproduction* 2005, 130, 193-201.
17. Rodrigues B. A., Rodrigues J. L.: Influence of reproductive status on in vitro oocyte maturation in dogs. *Theriogenology* 2003, 61, 59-66.
18. Rodrigues B. A., Rodrigues J. L.: Meiotic response of in vitro matured canine oocytes under different proteins and heterologous hormone supplementation. *Reprod. Domest. Anim.* 2003, 38, 58-62.
19. Saint-Diez M., Renard J. P., Chastant-Maillard S.: Follow-up chromatin, microtubule dynamics and kinase activities during in vitro maturation in the bitch oocyte. *Proc 14<sup>th</sup> Int. Cong. Anim. Reprod.* Stockholm 2000, s. 212.
20. Saint-Diez M., Renard J. P., Chastant-Maillard S.: Induction of final maturation by sperm penetration in vitro. *Biol. Reprod.* 1992, 46, 853-858.
21. Shimizu T., Tsutsui T., Murao I., Orima H.: Incidence for transuterine migration of embryos in the dog. *Jpn. J. Vet. Sci.* 1990, 52, 1273-1275.
22. Sirard M. A.: Resumption of meiosis: mechanism involved in meiotic progression and its relation with developmental competence. *Theriogenology* 2001, 55, 1241-1254.
23. Songsasen N., Yu I., Gomez M., Leibo S. P.: Effect of meiosis-inhibiting agents and equine chorionic gonadotropin on nuclear maturation of canine oocytes. *Mol. Reprod. Dev.* 2003, 65, 435-445.
24. Songsasen N., Yu I., Leibo S. P.: Nuclear maturation of canine oocytes cultured in protein-free media. *Mol. Reprod. Develop.* 2002, 62, 407-415.
25. Sutovsky P., Flechon J. E., Flechon B., Motlik J., Peynot N., Chesne P.: Dynamic changes of gap junctions and cytoskeleton during in vitro culture of cattle oocyte cumulus complexes. *Biol. Reprod.* 1993, 49, 1277-1287.
26. Tesoriero J. V.: A morphologic, cytochemical, and chromatographic analysis of lipid yolk formation in the oocytes of dog. *Gamete. Res.* 1982, 6, 267-279.
27. Tsutsui T.: Studies on the reproduction in the dog. On cleavage and transport of fertilized ova in the oviduct. *Jpn. J. Anim. Reprod.* 1975, 21, 70-75.
28. Verhage H. G., Fazleabas A. T., Mavrogianis P. A., O'Day-Bowman M. B., Schmidt A., Arias E. B.: Characteristic of an oviductal glycoprotein and its potential role in fertility control. *J. Reprod. Fertil. Suppl.* 1997, 51, 217-226.
29. Willingham-Rocky L. A., Hinrichs K., Westhusin M. E., Kraemer D. C.: Effects of stage of oestrous cycle and progesterone supplementation during culture on maturation of canine oocytes in vitro. *Reproduction* 2003, 126, 501-508.
30. Włodarczyk R., Bukowska D., Jaśkowski J. M.: Czynniki wpływające na dojrzewanie oocytów psa w warunkach in vitro. *Medycyna Wet.* 2007, 63, 389-393.
31. Yamada S., Shimazu Y., Kawano Y., Nakazawa M., Naito K., Toyota Y.: In vitro maturation and fertilization of preovulatory dog oocyte. *J. Reprod. Fertil. Suppl.* 1993, 47, 227-229.

Adres autora: dr Dorota Bukowska, ul. Wojska Polskiego 52, 60-625 Poznań; e-mail: dorbuk@au.poznan.pl