

Dojrzewanie *in vitro* komórek jajowych psa domowego

MAŁGORZATA KUNOWSKA-SŁÓSZARZ, URSZULA BAUMGART,
AGNIESZKA BORUTA, MARCIN GOŁĘBIEWSKI

Katedra Szczegółowej Hodowli Zwierząt, Wydział Nauk o Zwierzętach,
Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie, ul. Ciszewskiego 8, 02-786 Warszawa

Otrzymano 25.09.2013

Zaakceptowano 12.11.2013

Kunowska-Słószarz M., Baumgart U., Boruta A., Gołębiewski M.
In vitro maturation of the oocytes of domestic dog

Summary

The efficiency of the *in vitro* maturation of canine oocytes is still relatively small. The periovulation period in dogs is different from that in other animal species. This study presents the results of research on the use of various media and substances, such as serum and serum albumin, hormones, energy substrates, antioxidants, antibiotics, antimycotics, and other compounds supporting the maturation of oocytes *in vitro*. It also describes the methods of culturing oocytes (incubation in a drop, incubation with somatic cells, incubation in the isolated oviduct and in isolated follicles). If the research on conditions simulating the oviduct environment is continued, it may become possible to obtain a higher number of oocytes capable of fertilization than at the present time.

Keywords: dog, *in vitro* maturation, oocytes

Pierwsze prace dotyczące uzyskiwania zarodków *in vitro* u psów przeprowadzono ponad trzydzieści lat temu (26). W procesie dojrzewania komórek jajowych *in vitro* (*in vitro* maturation – IVM) jedynie 25% oocytów wznowiło mejozę, osiągając stadium metafazy pierwszego (MI) i drugiego podziału meiotycznego (MII). Do dnia dzisiejszego efektywność tego procesu jest niewielka (zdecydowanie mniejsza od efektywności dojrzewania oocytów innych zwierząt: laboratoryjnych, gospodarskich i domowych) i waha się w zależności od zastosowanej metody hodowli. Średnio 20% oocytów osiąga dojrzałość do zapłodnienia (38). Procent ten można zwiększyć poprzez wydłużenie czasu hodowli, ale krok ten niesie ze sobą również zwiększenie ilości przypadków degeneracji (23).

Dopracowanie IVM jest ważne z punktu widzenia rozwoju metod wspomaganey reprodukcji i niezbędne dla ustalenia optymalnych procedur IVP (*in vitro* production of embryos), ponieważ jakość dojrzewających *in vitro* oocytów wpływa na efektywność pozostałych etapów produkcji zarodków. Celem badań nad IVM jest odwzorowanie warunków panujących *in vivo*, tak więc kluczowym wyzwaniem jest dokładne poznanie czynników oddziałujących na oocyt w jajowodzie. Istotne jest również określenie, na jakim etapie dojrzewania cytoplazmatycznego znajduje się oocyt w chwili owulacji i jaki wpływ na proces dojrzewania ma

obecność plemników. Prawdopodobnie w tym właśnie kierunku prowadzone będą badania.

Oocyty psa owulowane są niedojrzałe do zapłodnienia, a stadium metafazy drugiego podziału meiotycznego (MII) osiągają dopiero w jajowodzie. Czynniki, które wpływają na kompetencje oocytu do ukończenia dojrzewania można podzielić na dwie kategorie: czynniki wpływające na oocyt w czasie wzrostu w pęcherzyku jajnikowym (np. nietypowe środowisko hormonalne, towarzystwo komórek ziarnistych, obecność systemu złącz szczelinowych) oraz czynniki wpływające na oocyt w świetle jajowodu już po owulacji (wym. czynniki i dodatkowo obecność i aktywność sekrecyjna komórek światła jajowodu, wpływające na skład płynu jajowodowego).

W czasie dojrzewania zachodzi szereg zmian morfologicznych i ultrastrukturalnych obejmujących jądro oraz cytoplazmę oocytu. W cytoplazmie dochodzi do modyfikacji i reorganizacji organelli, przykładowo do zwiększenia liczby mitochondriów. Następują zmiany transkrypcyjne wpływające na przebieg cyklu komórkowego, zmiany w metabolizmie komórki, wyrzucenie ciała kierunkowego i budowa wrzeciona podziałowego. Konsekwencją tych procesów jest prawidłowe zapłodnienie (24, 34).

Dodatkowo na proces dojrzewania wpływ mogą mieć plemniki, gdyż często są one obecne w drogach rodnych jeszcze przed osiągnięciem przez oocyt

stadium MII – między momentem osiągnięcia dojrzałości a momentem zapłodnienia *in vivo* występuje duże opóźnienie, które może wynieść nawet około 60 godzin (38).

W badaniach nad IVM często używa się pojęcia kompetencji rozwojowych oocyty i dlatego też niejednokrotnie w przypadku komórek jajowych, które przekroczyły stadium pęcherzyka zarodkowego (GV – germinal vesicle), rozróżniane są dwa stadia – stadium GVBD (germinal vesicle breakdown; pęknięcie pęcherzyka zarodkowego) i stadium MI-MII (zatem w obrębie jednej badanej grupy znajdują się oocyty, które wznowiły mejozę, jeszcze nie osiągnęły dojrzałości oraz MII). Otrzymane wyniki wskazują, czy stworzone *in vitro* warunki są bardziej czy mniej zbliżone do optymalnych oraz jak kształtuje się potencjał rozwojowy wybranych do badań oocytów.

Skład pożywki wykorzystywanej do IVM z oczyszczonych względów jest dominującym elementem wpływającym na efektywność procesu. Jako bazę stosuje się pożywki proste lub złożone. Spośród prostych wybierane są TYH (Modified Krebs-Ringer Bicarbonate Solution) (44) i syntetyczny płyn jajowodowy SOF (16) – zaprojektowany pierwotnie do IVM owczych oraz bydłych oocytów (41), a ze złożonych: TCM-199 (3, 10, 24, 31, 34), rzadziej CMRL 1066 (TCM-199 zawiera więcej witamin, kwasu askorbinowego i cysteiny, a co za tym idzie – ma wpływ na redukcję stresu oksydacyjnego) (27). Innym przykładem jest wykorzystana przez Otoi i wsp. (31) pożywka, w której wcześniej inkubowane były zarodki bydłce.

Pożywki mogą być wzbogacane różnymi substancjami: surowicami i albuminami surowiczymi, hormonami, substratami energetycznymi, antyoksydantami, antybiotykami i środkami przeciwwgrzybiczymi, buforami i innymi związkami.

Surowice i albuminy surowicze

Surowice i albuminy surowicze stanowią źródło protein w pożywce. Jak dowiedziono, ich obecność poprawia wyniki dojrzewania oocytów wielu gatunków zwierząt i jest szczególnie istotna, gdy oocyty pozbawione są otaczających je komórek ziarnistych wzgórka jajonośnego. W IVM oocytów psa wykorzystuje się szereg źródeł protein zróżnicowanych pod względem składu i pochodzenia. Najpowszechniej stosowana jest albumina surowicy bydłcej (BSA; bovine serum albumin) (15, 16, 18). Testowano różne warianty jej koncentracji (od 0,3% do 4%) (23), uzyskując zróżnicowane wyniki. Hewitt, Watson i England w swojej pracy (17) donosili, że optymalna koncentracja BSA dla IVM psich oocytów wynosi 0,3%, jednakże w 1999 r. podali to stwierdzenie w wątpliwość, sugerując, że wyższa (4%) zawartość albuminy bydłcej ma zdecydowanie silniejszy korzystny wpływ (SOF + 4% BSA) (16). Innym badanym źródłem protein dla pożywki jest płodowa surowica cielęca (FCS/FBS; fetal calf serum/fetal bovine serum) (18, 24, 26, 43). Przy

koncentracji przekraczającej 10% wyraźnej poprawie ulega jakość oocytów (FCS wpływa na zwiększenie ilości komórek ziarnistych, jednakże nie zwiększa liczby dojrzewających do zapłodnienia oocytów) (18, 23). Stosowano również surowice suk i krów w fazie rujowej (EBS – oestrus bitch serum i ECS – oestrus cow serum). Jak się okazało, EBS skuteczniej niż ECS wspomaga wznowienie przerwanej podziału mejozy, nie ma jednak wpływu na jego ukończenie (35) (EBS zawiera więcej estradiolu i progesteronu niż ECS) (28, 29). Otoi i wsp. (29) dowiedli, że zastosowanie surowicy pochodzącej od suk w fazie spokoju (*anoestrus*) daje gorsze efekty niż zastosowanie EBS (odpowiednio: 11,1% w porównaniu do 16,3%), co jest logiczne z fizjologicznego punktu widzenia. Mimo tego wyniki uzyskiwane przy suplementacji EBS bywają sprzeczne. Może być to konsekwencją zastosowania różnej metodyki określania fazy cyklu płciowego (badanie cytologiczne wymazu z pochwy, określenie koncentracji progesteronu we krwi) przy pobieraniu próbek. W efekcie próbki oznaczane przez autorów jako EBS mogą w rzeczywistości mieć różny skład i co za tym idzie – różne właściwości (28, 29). Jedyną metodą hodowli, w której dodatek protein nie wpływa znacząco na przebieg IVM, jest hodowla w pęcherzykach jajnikowych (6). Co prawda, w obecności BSA zwiększa się ilość oocytów w stadium GVBD i diakinezie (DK), ale nie dochodzi do poprawy wyników dojrzewania. Prawdopodobnie jest to związane z mocno ograniczoną wymianą substancji między pożywką i pęcherzykiem jajnikowym.

Hormony

Oocyty pozyskiwane są zazwyczaj przed owulacją, najczęściej z niedojrzałych, wzrastających jeszcze pęcherzyków jajnikowych, a co za tym idzie – w stosunkowo niewielkim stopniu poddawane są działaniu naturalnego środowiska hormonalnego. Można zatem przypuszczać, że dodatek hormonów będzie miał pozytywny wpływ na dojrzewanie *in vitro*. Okazuje się, że nie jest to tak jednoznaczne. Dodatek FSH (follicle stimulating hormone) do pożywki wspomaga wznowienie mejozy, nie wpływa jednak pozytywnie na odsetek oocytów osiągających stadium MII (35). Co więcej, obecność FSH i LH (luteinizing hormone) przez cały czas trwania hodowli powoduje wyraźne pogorszenie wyników dojrzewania (39). Prawdopodobnie zastosowanie gonadotropin w pierwszej połowie inkubacji będzie mieć pozytywny wpływ na IVM (*in vivo* poziom gonadotropin dynamicznie się zmienia: koncentracja FSH spada do względnie niskiego poziomu wraz z rozpoczęciem fazy przedrujowej (*proestrus*) i wzrasta 2-4-krotnie wraz z wyrzutem LH). Następnie poziom obu tych hormonów spada i oocyty znajdujące się w jajowodzie nie są ekspozowane na ich wpływ (40).

Stosuje się również dodatki innych hormonów. Kim i wsp. (21) w swojej pracy dowiedli, że suplementacja estradiolem-17 β samodzielnie, jak również

w połączeniu z progesteronem, poprawia wyniki IVM. Podobną opinię na ten temat wyrazili Nickson i wsp. (28). Pozytywny wpływ na ostateczne wyniki IVM ma również połączenie estradiolu i eCG/hCG (equine chorionic gonatotropin/human chorionic gonadotropin) (43). Natomiast zastosowanie samej gonadotropiny kosmówkowej (klaczy lub ludzkiej) ma pozytywny wpływ na proces dojrzewania oocytów tylko do stadium MI przy inkubacji trwającej 60-240 minut. Niestety, nie ma ona wpływu na ilość oocytów osiagających MII (38). Ograniczoną użyteczność ma też bST (bovine somatotropin): wzmaga proliferację komórek ziarnistych, sprzyja wznowieniu mejozy, ale nie wykazuje pozytywnego wpływu na wyniki dojrzewania (38). Natomiast Rodrigues i Rodrigues (35) stwierdzili, że dodatek 1 µg/ml hST (human somatotropin) skutkuje nieznacznym zwiększeniem liczby dojrzewających oocytów. Przeprowadzono również badania dotyczące dodatku insuliny do pożywki: okazało się, że jej obecność, w połączeniu z dodatkiem transferyny i selenu, wpływa pozytywnie na ilość oocytów osiagających metafazę i anafazę pierwszego podziału mejotycznego (MI i AI) oraz metafazę drugiego podziału mejotycznego (MII) (36).

Substraty energetyczne oraz antyoksydanty

Kolejną kategorią substancji, których wpływ na IVM badano, są substraty energetyczne (glukoza i pirogronian) oraz antyoksydanty (np. glutation, βME – β merkaptotanol). Jak się okazuje, glukoza nie wspomaga procesu dojrzewania oocytów psa, natomiast zastosowanie pirogronianu daje niejasne wyniki: nieznacznie zwiększa odsetek oocytów w MII, ale inni autorzy referują podobne efekty uzyskane w oparciu o pożywki go pozbawione (39). Jako substancję zapobiegającą stresowi oksydacyjnemu badano βME i L-glutaminę. Są to prekursorzy syntetyzowanego przez komórki glutationu (23), który posiada właściwości antyoksydacyjne i ma pozytywny wpływ na rozwój oocytów wielu gatunków ssaków, np.: bydła (27) lub świń (1). W związku z wysoką zawartością lipidów w cytoplazmie psich oocytów można się spodziewać, że dodatek tych związków będzie miał pozytywny wpływ na wyniki dojrzewania. Rzeczywiście, βME poprawia wyniki dojrzewania, jednak jego działanie jest ściśle związane z zastosowaną dawką (optymalny dodatek do pożywki to 50-100 µM) (22). Wśród substancji używanych dla poprawienia dojrzewania *in vitro* stosowana bywa również cysteamina (3) wspomagająca wznowienie mejozy i rozwój oocytu aż do fazy MII u świń (2).

Antybiotyki i środki przeciwgrzybicze

Regułą jest dodawanie do pożywek antybiotyków (penicylina, streptomycyna (16), gentamycyna (44) i substancji grzybobójczych – Fungizone (16) w celu uniknięcia patogennego wpływu rozwoju drobnoustrojów na hodowlę.

Bufory

Standardowo do pożywek (ze względu na swoje właściwości buforujące) dodawany jest HEPES. Pozwala on na utrzymanie w czasie inkubacji fizjologicznego pH (ponieważ odczyn zmienia się pod wpływem zmian w stężeniu dwutlenku węgla związanych z oddychaniem komórkowym). Często również dodatkiem do pożywki jest neutralizujący kwasy NaHCO₃.

Inne związki

Badano również wpływ EGF (epidermal growth factor) na dojrzewanie *in vitro* oocytów psa. W przypadku IVM oocytów kota domowego (37), bizona (32), kozy (12) czy oocytów bydłych (20) i ludzkich (14) odznacza się on pozytywnym wpływem. Stosowany w IVM oocytów psa wzmaga proliferację komórek ziarnistych i wpływa na wyniki dojrzewania, są one jednak ściśle związane z zastosowaną dawką EGF: Kim i wsp. (22) ustalili, że jego optymalna zawartość w pożywce wnosi 20 ng/ml przy 72-godzinnej inkubacji. Podobnie pozytywny wpływ na efektywność IVM ma zastosowanie połączenia EGF z LH lub estradiolem (5, 7). Ich działanie jest wyraźnie synergiczne, w przeciwieństwie do połączenia EGF z FSH, które zatrzymuje proces dojrzewania psich oocytów (5).

Należy pamiętać, że do badań nad oddziaływaniem konkretnych substancji na proces dojrzewania *in vitro* najlepiej wybrać pożywki o mało skomplikowanym składzie. Pozwala to na łatwiejsze stwierdzenie i scharakteryzowanie wpływu zastosowanego dodatku (25).

Dotychczas nie udało się zaprojektować pożywki, która stanowiłaby złoty środek. Z badań nad wzbogacaniem pożywek można wyciągnąć wniosek, że niewiele wiadomo na temat środowiska panującego w jajowodzie. Bez tej wiedzy projektowanie odpowiedniej pożywki jest zadaniem nie tylko niebywale skomplikowanym, ale być może nawet niemożliwym.

Niezwykle ważnym aspektem jeżeli chodzi o dojrzewanie komórek jajowych jest oprócz pożywek odpowiednia metoda hodowli. W dojrzewaniu *in vitro* psich oocytów stosowane są cztery metody: inkubacja w kropli, inkubacja w towarzystwie komórek/na monowarstwie komórek, inkubacja w jajowodzie oraz inkubacja w wyizolowanych pęcherzykach jajnikowych.

Inkubacja w kropli

Najczęściej stosowaną metodą dojrzewania oocytów *in vitro* jest hodowla w kropli. Polega ona na inkubacji niewielkich grup oocytów w kroplach pożywki o różnej objętości, przykrytych olejem mineralnym (olej parafinowy). Dodatkowym czynnikiem wpływającym na efektywność IVM w tej metodzie jest stosunek objętości pożywki do ilości inkubowanych oocytów. Zastosowanie dużej gęstości hodowli może negatywnie odbić się na wynikach dojrzewania. Efekt ten jest prawdopodobnie związany z substancjami o właściwościach inhibitujących, wydzielanymi przez

komórki ziarniste wzgórka jajonośnego. Podobne zjawisko opisano w przypadku świńskich oocytów (19). Jedynie praca opublikowana w 2002 r. przez Otoi i wsp. analizuje ten problem w kontekście oocytów psa pozyskanych od suk w fazie spokoju (*anoestrus*) i fazie porujowej (*diestrus*) (31). Wyniki pokazały, że gęstość hodowli nie wpłynęła na IVM oocytów z *diestrus*, natomiast wyraźnie odbiła się na wynikach dojrzewania oocytów z *anoestrus*. Co ciekawe, więcej oocytów (16,2%) dojrzało w systemie 10 COCs (cumulus oocyte complex) – 100 µl pożywki niż przy inkubowaniu w tej samej objętości 5 COCs (4,6%) (31). Jest to cenna informacja, ponieważ sugeruje, że w niektórych przypadkach większe zagęszczenie hodowli pozytywnie wpływa na proces dojrzewania. Tymczasem w większości badań stosuje się niewielkie grupy oocytów (23). Niemniej jednak możliwe jest, że w przypadku oocytów pochodzących z innych faz cyklu płciowego wpływ gęstości hodowli na IVM kształtować się będzie inaczej.

Efektywność dojrzewania w kropli waha się w zależności od zastosowanych warunków inkubacji. Yamada i wsp. (44) umieszczali wypłukane kompleksy oocyt–komórki ziarniste w 400 µl kroplach pożywki na bazie TYH, wzbogaconej 10% inaktywowanej cieplem FBS (firmy GIBCO Labs.) i 30 mg/l gentamycyny (Bio Products Inc.), w plastikowych naczyniach hodowlanych, pod olejem mineralnym (E.R. Squibb&Sons, Inc.). W każdej kropli znajdowało się od 15 do 20 oocytów. Naczynia pozostawiono w inkubatorze, w temperaturze 37°C przy 5% zawartości dwutlenku węgla w powietrzu. Wyniki dojrzewania oceniano po 24, 48 i 72 godzinach hodowli. Przy pierwszej ocenie 88,6% oocytów znajdowało się w fazie GVBD. Po 48 godzinach 27,3% oocytów osiągnęło dojrzałość, 4,5% znajdowało się w telofazie pierwszego podziału mejotycznego, a pozostałe 68,2% nadal na etapie zaniku pęcherzyka zarodkowego. Po 72 godzinach liczba oocytów w metafazie drugiego podziału mejotycznego wyniosła 31,9%. Pozostałe oocyty znajdowały się w fazie TI (1%), AI (1%), MI (2,7%), ProMI (1,6%) lub pozostały na etapie GVBD (62,6%), a większość z nich pozostała w fazie zaniku pęcherzyka zarodkowego. Autorzy przypuszczają, że może to być związane z nieodpowiednimi warunkami inkubacji lub faktem, że część oocytów pobieranych z pęcherzyków jajnikowych w warunkach naturalnych wcale by nie owulowało (44). Efekty IVM osiągnięte w tej pracy nie są drastycznie małe, niemniej jednak pokrywają się z tymi opublikowanymi przez Mahi i Yanagimachi (26).

Hewitt i England (16) zastosowali dwie pożywki: SOF wzbogacone 0,3% lub 4% dodatkiem BSA. Oocyty umieścili po 10 w 400 µl kroplach, w plastikowych naczyniach hodowlanych i przykryli olejem mineralnym (Sigma). Inkubacja trwała 96 godzin i odbywała się w temperaturze 39°C, przy standardowej zawartości dwutlenku węgla w powietrzu.

Po jej ukończeniu oocyty poddano ocenie: tylko 7% oocytów dojrzewających w SOF z dodatkiem 4% BSA osiągnęło stadium MI/AI/MII, a 45,5% pozostało na etapie GVBD. Natomiast w pożywce SOF + 0,3% BSA dojrzało 3% oocytów, podczas gdy 38,5% osiągnęło stadium GVBD. Badanie to dowodzi pozytywnego wpływu dodatku większej ilości bydlęcej albuminy surowiczej (4% w stosunku do najczęściej stosowanych 0,3%).

Zdecydowanie bardziej skomplikowaną pożywkę zastosowali Rodrigues i wsp. (34). Porównywali oni dwa media na bazie TCM 199 (TCM 199, HEPES, 10% FCS, gentamycyna, wodorowęglan sodu, pirogronian oraz 0,5 µg/ml FSH i 0,03 UI/ml hCG). Do pierwszej pożywki dodano 1 µg/ml estradiolu, a do drugiej 20 µg/ml estradiolu i 1 µg/ml hST.

Oocyty inkubowano po 25 sztuk w 100 µl kroplach pod olejem mineralnym w temperaturze 37°C przez 72 godziny. Po tym czasie dokonywano oceny oocytów i porównania użyteczności obu pożywek. Osiągnięto zaledwie 1,9% oocytów MII w pożywce o mniejszej zawartości estradiolu oraz 3,5% w pożywce z większą zawartością estradiolu i obecnością ludzkiej somatotropiny, i tak jak w innych przytoczonych w tej pracy wynikach, większą część stanowiły oocyty w fazie GVBD. Duża liczba oocytów była zdegenerowana, a w wielu przypadkach nie udało się określić stadium dojrzewania. Autorzy przypisują niską efektywność IVM niewłaściwie dobranym warunkom hodowli (niefizjologiczna jest sama obecność FSH w pożywce przez cały czas trwania inkubacji). Widać jednak, że większa ilość estradiolu i obecność hST pozytywnie wpłynęły na proces dojrzewania (34).

W większości przypadków nie jest możliwe uzyskanie zarodków w oparciu o oocyty, które dojrzewały *in vitro*. Udało się to jednak zespołowi England, Verstegen, Hewitt (10), którzy również posłużyli się metodą inkubacji w kropli. Wykorzystano TCM-199 modyfikowany HEPESem i wzbogacony 0,3% BSA, a więc pożywkę stosunkowo mało skomplikowaną. Inkubację prowadzono w kroplach zawierających po 2-10 oocytów w standardowych warunkach (5% dwutlenku węgla w atmosferze i 37°C) przez 24-72 godziny. W wyniku zapłodnienia *in vitro* tych oocytów udało się uzyskać ciążę (10).

Metoda inkubacji w kropli stanowi znaczące odejście od warunków dojrzewania oocytów *in vivo*. Zdecydowanie bardziej fizjologiczne warunki stwarzają metody wykorzystujące obecność komórek jajowodu.

Inkubacja w obecności komórek/na monowarstwie komórek

Kolejną metodą jest inkubacja oocytów w obecności komórek lub na komórkowej monowarstwie. Polega ona na umieszczeniu w pożywce do IVM określonych typów komórek, które poprzez swoją obecność i wydzielane substancje mają za zadanie wspomagać proces

dojrzwania. Otoi i wsp. (30) badali wpływ obecności bydlęcych komórek ziarnistych wzgórka jajonośnego na wznowienie i ukończenie mejozy przez inkubowane oocyty, wykorzystując pożywkę, w której uprzednio rozwijały się zarodki bydlęce. Po zakończeniu 72-godzinnej inkubacji w 37,5°C, w powietrzu zawierającym 5% dwutlenku węgla odkryli, że komórki te zdecydowanie zwiększają liczbę oocytów wznawiających mejozę (26% oocytów GVBD w stosunku do 9,9% w grupie kontrolnej). Jednak po wykonaniu zapłodnienia *in vitro* oraz hodowli zarodków okazało się, że pozytywny wpływ bydlęcych komórek ziarnistych na proces dojrzwania nie przekłada się na zwiększenie kompetencji rozwojowych zarodka (i tu uwidacznia się problem oceny dojrzwania cytoplazmatycznego i optymalnych dla tego procesu warunków). Tym niemniej w wyniku badania udało się uzyskać jedną blastocystę (30).

W 1999 r. Hewitt i England (16) podjęli się zbadania wpływu inkubacji oocytów w obecności komórek nabłonka jajowodu suki na wyniki IVM (wiadomo, że zastosowanie hodowli w jajowodzie lub z jego komórkami epitelialnymi jest użyteczne w przypadku innych ssaków) (9, 13). W czasie trwania owariohisterektomii pobrano i oczyszczono z przyległych tkanek jajowody (jak wykazało badanie wymazu z pochwy, suki znajdowały się w fazie *diestrus*). Na potrzeby badania przetestowano 4 metody pozyskiwania komórek nabłonkowych: płukanie jajowodów (stosowane wcześniej u krów i owiec) (8), miażdżenie jajowodów kleszczykami w celu uwolnienia komórek nabłonkowych (wykonywana na krowich jajowodach) (11, 42) oraz zeszkrobywanie komórek z nabłonka przeciętego wzdłuż jajowodu, w dwóch wariantach: wykonywane ostrzem skalpela (metoda stosowana u owiec) (33) lub szkiełkiem mikroskopowym. Pozyskane komórki barwiono błękitem trypanowym (Sigma) w celu określenia ich przydatności (komórki wartościowe pozostały niewybarwione) i porównano metody poprzez określenie liczby przydatnych do hodowli komórek za pomocą hemocytometru. W oparciu o tę procedurę wybrano najbardziej efektywną metodę pozyskania komórek epitelialnych (zeszkrobywanie skalpelem) i zastosowano ją. W czasie badania wykorzystano 4 typy pożywek na bazie TCM-199. Kontrolne pożywki składały się z TCM-199 + 0,3% BSA i TCM-199 + 0,5 mg/ml insuliny + 0,5 mg/ml transferyny + 0,5 µg/ml selenu + 10 µg/ml EGF + 2 g/ml Fungizone. Do pożywek doświadczalnych dodano komórki nabłonka jajowodu suki, w każdym przypadku stosując objętość 400 µl. Pożywki przed hodowlą nakropiono na szalki Petriego, przykryto olejem mineralnym i wstawiono do inkubatora na 6 godzin, w temperaturze 39°C i obecności 5% dwutlenku węgla w powietrzu. Następnie przez 48 i 96 godzin inkubowano oocyty (po 10 w każdej 400 µl kropli, przy zawartości komórek epitelialnych równej w przybliżeniu $7,5 \times 10^4/\text{ml}^{-1}$) pod olejem mineralnym w identycznych warunkach. Po zakończeniu

hodowli stwierdzono, że przy 48-godzinnej inkubacji nie ma różnic efektywności IVM (liczbie oocytów GVBD i MI-MII) pomiędzy pożywkami zawierającymi komórki nabłonka i ich pozbawionymi. Różnice pojawiły się dopiero po 96 godzinach hodowli: mimo że dodatek komórek nie zwiększył ilości wznawiających mejozę oocytów to przełożył się pozytywnie na ilość oocytów osiagających stadia MI-MII, jednak nadal skuteczność IVM pozostała na niskim poziomie: maksymalnie 9% oocytów osiagnęło stadia powyżej metafazy pierwszego podziału mejotycznego. Autorzy sądzą, że może być to konsekwencją zastosowania komórek pochodzących z jajowodów suk będących w fazie *diestrus*: gdyby kolekcjonowano je w czasie fazy przedrujowej (*proestrus*) i rujowej (*oestrus*) ich działalność sekrecyjna kształtowałaby się inaczej, prawdopodobnie lepiej wspierając proces dojrzwania *in vitro*. Należy również pamiętać, że w badaniu wykorzystano tylko część obecnych w jajowodzie typów komórek, co za tym idzie – nie można było wiernie odwzorować warunków *in vivo* (16).

Zespół Bogliolo i wsp. (3) poszedł dalej, wykorzystując komórki epitelialne lejka i bańki jajowodu pochodzące od suk będących w *oestrus* (fazę cyklu potwierdzono określając poziom progesteronu w osoczu krwi i badając wymaz z pochwy). Jajowody wycięto podczas owariohisterektomii, przepłukano w PBS z dodatkiem antybiotyków, a następnie przecięto wzdłuż. Komórki pozyskano poprzez zeszkrobywanie mikroostrzem i przepłukano kilkakrotnie w pożywce TCM-199 wzbogaconej buforującym HEPESem. Bezpośrednio przed IVM umieszczono je w stosownej pożywce ($10^4/\text{ml}^{-1}$, liczba określona hemocytometrem Bürkera). Przy dojrzwaniu wykorzystano pożywkę kontrolną: TCM-199 + 10% EBS + 0,1 UI/ml⁻¹ FSH (Pluset, Serono Veterinary) + 0,1 UI/ml⁻¹ LH (Pluset, Serono Veterinary) + 1 µg/ml⁻¹ progesteronu + 1 µg/ml⁻¹ estradiolu + 100 µM cysteaminy. Drugie medium zostało wzbogacone o komórki lejka jajowodu, a trzecie o komórki pochodzące z bańki jajowodu.

Oocyty umieszczono na płytkach hodowlanych ze studzienkami (po 30 oocytów w każdym mililitrze pożywki) i inkubowano w temperaturze 39°C, w powietrzu o standardowej zawartości dwutlenku węgla. Po 48 godzinach dokonano oceny: w pożywce kontrolnej 4% oocytów osiagnęło fazę MII, w pożywce z dodatkiem komórek lejka jajowodu – 15,6%, zaś w pożywce z komórkami bańki jajowodowej – 16,7%. Po upływie 72 godzin udział dojrzałych oocytów zwiększył się i wyniósł: w pożywce kontrolnej – 6%, w pożywce z komórkami lejka – 18,5%, a w pożywce wzbogaconej komórkami bańki jajowodu – 23,2%. Jak widać, najbardziej intensywny wpływ na efektywność IVM miał dodatek komórek lejka, jednak badanie dowiodło również pozytywnego wpływu obecności komórek bańki jajowodu. Autorzy zwrócili uwagę na różnice efektywności dojrzwania w zależności od typu zastosowanych komórek. Jak wiadomo, poszczególne

odcinki jajowodu są zróżnicowane pod względem typów komórek, aktywności wydzielniczej (16, 24) i przebiegających w nich procesów. Prawdopodobnie na wyniki pracy miał również wpływ moment pozyżskania jajowodów – faza rujowa (*oestrus*) (3, 16).

Inkubacja w wyizolowanym jajowodzie

Najbardziej zaawansowaną pod względem naśladowania fizjologicznych warunków dojrzewania jest metoda inkubacji oocytów w wyizolowanym jajowodzie (24). Na potrzeby dojrzewania oocytów psa badano zarówno wariant IVM w jajowodzie otwartym (rozciętym wzdłuż, z wyeksponowaną śluzówką), jak i hodowlę w jajowodzie zamkniętym (podwiązany z obu stron). W odróżnieniu od innych metod, w tej oocyty dojrzewają w otoczeniu wszystkich komórek występujących w jajowodzie i mają kontakt fizyczny z nabłonkiem. Luvoni i wsp. (24) wykorzystali odcinki cieśni i bańki jajowodu pobrane w czasie owariohisterektomii od suk będących w różnych stadiach cyklu płciowego i zastosowano pożywkę składającą się z TCM-199 z dodatkiem antybiotyków, 5% FBS, 0,5 UI FSH i 0,5 UI LH (Serono Veterinary). Jajowody przepłukano w PBS zawierającym 100 mg/ml streptomycyny, 100 000 UI/ml penicyliny G oraz 250 µg/ml amfoterycyny B i umieszczono na szalkach Petriego, uprzednio przygotowując do IVM: jeden z jajowodów przecięto wzdłuż, odsłaniając śluzówkę, a drugi podwiązano na jednym końcu. Przy pomocy szklanej pipety umieszczono w jajowodach niewielką ilość pożywki zawierającej oocyty: na powierzchni śluzówki otwartego jajowodu (po 10 oocytów) i wewnątrz zamkniętego (po 20 oocytów), który podwiązano, by zapobiec wypływowi roztworu. Całość umieszczono w inkubatorze, w temperaturze 38,5°C i standardowej zawartości dwutlenku węgla. Jako próbę kontrolną przeprowadzono dojrzewanie w kropli pożywki pod olejem mineralnym. Po 30 godzinach inkubacji 20,4% oocytów w grupie kontrolnej wznowiło mejozę, w otwartym jajowodzie 27,1%, a w zamkniętym 63,8%. Zastosowanie inkubacji w zamkniętym jajowodzie pozwoliło na osiągnięcie stadiów MI/MII przez 12,5-31,9% oocytów (dla porównania, przy hodowli w kropli ich udział wynosił 3,7%). Okazało się, że przedłużenie czasu jego inkubacji poza 30 godzin nie spowodowało wzrostu liczby wznawiających mejozę oocytów, co więcej, zwiększyła się liczba oocytów zdegenerowanych (24).

Inkubacja w wyizolowanych pęcherzykach jajnikowych

Zamysłem stanowiącym podwaliny tej metody jest teza, iż wykorzystanie pęcherzyków jajnikowych w IVM pozwoli na stworzenie bardziej fizjologicznych warunków dla dojrzewania oocyty. Wydaje się ona jednak nieco dyskusyjna, ponieważ oocyt psa opuszcza pęcherzyk jajnikowy, będąc w metafazie I podziału mejotycznego, co za tym idzie – *in vivo* pęcherzyki

stanowią środowisko dla pierwszej części procesu dojrzewania do zapłodnienia. Procedura ta została zastosowana jako element IVP między innymi u myszy, jednak nadal charakteryzuje się niską efektywnością.

Bolamba i wsp. (4) wykorzystali pęcherzyki EAN (trzeciorzędowe pęcherzyki jajnikowe, antralne) i APAN (drugorzędowe pęcherzyki jajnikowe, prenatalne) pozyskane metodą enzymatyczną (jej zastosowanie przełożyło się na zwiększoną liczbę oocytów GVBD jeszcze przed rozpoczęciem IVM). Pierwszym krokiem było płukanie pęcherzyków jajnikowych w roztworze składającym się z pożywki BWW wzbogaconej 0,1% dodatkiem BSA, w temperaturze pokojowej i ponowne płukanie w tym samym roztworze w temperaturze 37°C. W czasie inkubacji wykorzystano 24-studzienkowe naczynia do hodowli tkankowych (Mostar, Sigma). Aby zapobiec utracie komórek ziarnistych i zachować prawidłową strukturę pęcherzyków jajnikowych, naczynia pokryto 350 µl 0,6% (wt/v) roztworu agaru w BWW (bez dodatku BSA) i umieszczono w 4°C, a bezpośrednio przed rozpoczęciem hodowli tak przygotowane płytki hodowlane podgrzano przez 3 godziny w 37°C. W każdej studzience umieszczono 400 µl DME/F-12 – złożonej pożywki hodowlanej zawierającej dodatek 15 mM HEPES i 2,5 mM L-glutaminy, która wzbogacona została następującymi substancjami: 20% (wt/v) inaktywowanego ciepłem FBS (Sigma), 2 mM L-glutaminy (Sigma), 1% (wt/v) mieszanki antybiotyków i środków przeciwwgrzybiczych (Gibco), 1 µg FSH/ml (Sigma), 10 UI hCH/ml (Sigma) i 1 µg estradiolu-17β/ml (Sigma).

W każdej studzience umieszczono po 2-12 oocytów (zatem 400 µl pożywki na 2-12 oocytów) i inkubowano w temperaturze 37°C oraz standardowej zawartości CO₂ przez 24, 48 lub 72 godziny. Po 24 godzinach uzyskano istotne zwiększenie się liczby przypadków degeneracji. W kolejnych godzinach procent ten pozostał na stałym, wysokim poziomie (co mija się z tezą głoszącą, że wydłużenie czasu hodowli bezpośrednio przekłada się na wzrost przypadków degeneracji) (23). Największy odsetek oocytów GVBD-MII zanotowano po 48 godzinach inkubacji (APAN – 11,5%; EAN – 8,7%). Charakterystycznym dla tej pracy elementem jest duży udział oocytów GVBD jeszcze przed inkubacją (około 24%). Jest on związany z enzymatyczną izolacją pęcherzyków jajnikowych, najprawdopodobniej jako konsekwencja wystąpienia spontanicznych wznowień mejozy – zjawiska opisywanego wcześniej również w kontekście oocytów innych gatunków i wynikającego z ich atrezji. Oocyty takie mimo wznowienia mejozy podlegają degeneracji, zawiązując jednocześnie odsetek oocytów GVBD-MII (4).

Uzyskane wyniki wskazują, że zastosowanie dojrzewania w wyizolowanych pęcherzykach jajnikowych pozwala na uzyskanie wznowienia mejozy, jednak warunki inkubacji wymagają (jak w przypadku wszystkich metod IVM psich oocytów) wnikliwej analizy i dalszych badań. Wiadomo, że progres od MI do MII

udało się uzyskać u innych gatunków – myszy, szczurów oraz małp rezusów (4).

Z przedstawionych danych wynika, że stosowane w chwili obecnej metody hodowli oocytów psa domowego nie przynoszą oczekiwanych rezultatów. Proces dojrzewania *in vitro* oocytów tego gatunku zwierząt wciąż wymaga pogłębienia wiedzy o środowisku jajowodu suki i fizjologii samej komórki jajowej. Umożliwi to stworzenie w przyszłości odpowiednich warunków hodowli i osiągnięcie *in vitro* zdolności do zapłodnienia przez komórki jajowe psa domowego.

Piśmiennictwo

1. *Abeysdeera L. R., Wang W. H., Cantley T. C., Prather R. S., Day B. N.*: Presence of β -mercaptoethanol can increase the glutathione content of pig oocytes matured in vitro and the rate of blastocyst development after in vitro fertilization. *Theriogenology* 1998, 50, 747-756.
2. *Bing Y. X., Nagai T., Rodrigues-Martinez H.*: Effect of cysteamine, FSH and estradiol-17 β on in vitro maturation of porcine oocytes. *Theriogenology* 2001, 55, 867-876.
3. *Bogliolo L., Zedda M. T., Ledda S., Leoni G., Naitana S., Pau S.*: Influence of co-culture with oviductal epithelial cells on in vitro maturation of canine oocytes. *Reprod. Nutr. Dev.* 2002, 42, 265-273.
4. *Bolamba D., Borden-Russ K. D., Durrant B. S.*: In vitro maturation of domestic dog oocytes cultured in advanced preantral and early antral follicles. *Theriogenology* 1998, 49, 933-942.
5. *Bolamba D., Russ K. D., Harper S. A., Sandler J. L., Durrant B. S.*: Effects of epidermal growth factor and hormones on granulosa expansion and nuclear maturation of dog oocytes in vitro. *Theriogenology* 2006, 65, 1037-1047.
6. *Bolamba D., Russ K. D., Olson M. A., Sandler J. L., Durrant B. S.*: In vitro maturation of bitch oocytes from advanced preantral follicle in synthetic oviduct fluid medium: serum is not essential. *Theriogenology* 2002, 58, 1689-1703.
7. *Conti M., Hsien M., Park J. Y., Su Y. Q.*: Role of EGF network in ovarian follicles. *Mol. Endocrinology* 2006, 20, 715-723.
8. *Ellington J. E., Farrel P. B., Simkin M. E., Forte R. H., Goldman E. E., McGrath A. B.*: Development and survival after transfer of cow embryos cultured from 1-2 cells to morulae or blastocyst in rabbit oviducts or in sample medium with bovine oviduct epithelial cells. *J. Reprod. Fert.* 1990, 89, 293-299.
9. *Elliot D. S.*: Ova and embryo metabolism: functions of the oviduct. Johnson A. D. i Foley C. W. (eds). *The Oviduct and its Function*. Academic Press, New York 1974, 300-332.
10. *England G. C. W., Versteegen J. P., Hewitt D. A.*: Pregnancy following in vitro fertilization of canine oocytes. *Vet. Rec.* 2001, 148, 20-22.
11. *Eyestone W. H., First N. L.*: Coculture of early cattle embryos to the blastocyst stage with oviductal tissue or in conditioned medium. *J. Reprod. Fert.* 1989, 85, 715-720.
12. *Gall L., Boulesteix C., Ruffini S., Germain G.*: EGF-induced EGF-receptor and MAP kinase phosphorylation in goat cumulus cells during in vitro maturation. *Mol. Reprod. Dev.* 2005, 71, 489-494.
13. *Gandolfi F., Moor R. M.*: Stimulation of early embryonic development in the sheep by co-culture with oviduct epithelial cells. *J. Reprod. Fert.* 1987, 81, 23-28.
14. *Gomez E., Tarin J. J., Pellicer A.*: Oocyte maturation in humans: the role of gonadotropins and growth factor. *Fert. Steril.* 1993, 60, 40-46.
15. *Hewitt D. A., England G. C. W.*: Effect of preovulatory endocrine events upon maturation of oocytes of domestic bitches. *J. Reprod. Fert. Suppl.* 1997, 51, 83-91.
16. *Hewitt D. A., England G. C. W.*: Synthetic oviductal fluid and oviductal cell coculture for canine oocyte maturation in vitro. *Anim. Reprod. Sci.* 1999, 55, 63-75.
17. *Hewitt D. A., Watson P. F., England G. C. W.*: Effect of concentration of serum on in vitro maturation of domestic bitch oocytes. *J. Reprod. Fert.* 1995, Abstr. 15, 66-67.
18. *Hewitt D. A., Watson P. F., England G. C. W.*: Nuclear staining and culture requirements for in vitro maturation of domestic bitch oocytes. *Theriogenology* 1998, 49, 1083-1101.
19. *Isobe N., Terada T.*: Effect of the factors inhibiting germinal vesicle break down on the disruption of gap junctions and cumulus expansion of pig cumulus-oocyte complexes cultured in vitro. *Reproduction* 2001, 121, 249-257.
20. *Izadyar F., Hage W. J., Colenbrander B., Bevers M. M.*: The promotory effect of growth hormone on the developmental competence of in vitro matured bovine oocytes is due to improved cytoplasmic maturation. *Mol. Reprod. Dev.* 1998, 49, 444-453.
21. *Kim M. K., Fibrianto Y. H., Oh H. J., Jang G., Kim H. J., Lee K. S., Kang S. K., Lee B. C., Hwang W. S.*: Effects of the estradiol-17 β and progesterone supplementation on in vitro nuclear maturation of canine oocytes. *Theriogenology* 2005, 63, 1342-1353.
22. *Kim M. K., Fibrianto Y. H., Oh H. J., Jang G., Kim H. J., Lee K. S., Kang S. K., Lee B. C., Hwang W. S.*: Effect of β -mercaptoethanol or epidermal growth factor supplementation on in vitro maturation of canine oocyte collected from dogs with different stage of estrous cycle. *J. Vet. Sci.* 2004, 5, 253-258.
23. *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.
24. *Luvoni G. C., Chigioni S., Allievi E., Macis D.*: Meiosis resumption of canine oocytes cultured in the isolated oviduct. *Reprod. Dom. Anim.* 2003, 38, 410-414.
25. *Luvoni G. C., Chigioni S., Beccaglia M.*: Embryo Production in Dogs: from in vitro Fertilization to Cloning. *Reprod. Dom. Anim.* 2006, 41, 286-290.
26. *Mahi C. A., Yanagimachi R.*: Maturation and sperm penetration of canine ovarian oocytes in vitro. *J. Exp. Zoology* 1976, 196, 189-196.
27. *Matos D. G. de, Furnus C. C.*: The importance of having high glutathione (GSH) level after in vitro maturation on embryo development: effect of β -mercaptoethanol, cysteine and cystine. *Theriogenology* 2000, 53, 761-771.
28. *Nickson D. A., Boyd J. S., Eckersall P. D., Ferguson J. M., Harvey M. J. A., Renton J. P.*: Molecular biological methods for monitoring oocyte maturation and in vitro fertilization in bitches. *J. Reprod. Fert. Suppl.* 1993, 47, 231-240.
29. *Otoi T., Fujii M., Tanaka M., Ooka A., Suzuki T.*: Effect of serum on the in vitro maturation of canine oocytes. *Reprod. Fert. Dev.* 1999, 11, 387-390.
30. *Otoi T., Murakami M., Fujii M., Tanaka M., Ooka A., Une S., Suzuki T.*: Development of canine oocytes matured and fertilized in vitro. *Vet. Rec.* 2000, 146, 52-53.
31. *Otoi T., Willingham L., Shin T., Kraemer D. C., Westhusin M.*: Effects of culture density on meiotic competence of canine oocytes. *Reproduction* 2002, 124, 775-781.
32. *Purohit G. N., Brady M. S., Sharma S. S.*: Influence of epidermal growth factor and insulin-like growth factor 1 on nuclear maturation and fertilization of buffalo cumulus oocyte complex in serum free media and their subsequent development in vitro. *Anim. Reprod. Sci.* 2005, 87, 229-239.
33. *Rexroad C. E. Jr., Powell A. M.*: Development of ovine embryos cocultured on oviductal cells, embryonic fibroblasts or STO cell monolayers. *Biol. Reprod.* 1993, 49, 789-793.
34. *Rodrigues B. A., dos Santos L. C., Rodrigues J. L.*: Embryonic development of in vitro matured and in vitro fertilized dog oocytes. *Mol. Reprod. Dev.* 2004, 67, 215-223.
35. *Rodrigues B. A., Rodrigues J. L.*: Meiotic response of in vitro matured canine oocytes under different proteins and heterologous hormone supplementation. *Reprod. Dom. Anim.* 2003, 38, 58-62.
36. *Rota A., Cabianca G.*: In vitro maturation rates of canine oocytes from anoestrous bitches in simple media. *Reprod. Nutr. Dev.* 2004, 44, 105-109.
37. *Schramm R. D., Bevister B. D.*: Effects of gonadotrophins, growth hormone and prolactin on developmental competence of domestic cat oocytes matured in vitro. *Reprod. Fert. Dev.* 1995, 7, 1061-1066.
38. *Songsasen N., Wildt D. E.*: Oocyte biology and challenges in developing in vitro maturation systems in the domestic dog. *Anim. Reprod. Sci.* 2007, 98, 2-22.
39. *Songsasen N., Yu I., Leibo S. P.*: Nuclear maturation of canine oocytes cultured in protein-free media. *Mol. Reprod. Dev.* 2002, 62, 407-415.
40. *Ściesiński K.*: Hodowla psów. *SGGW* 2004, 198-207.
41. *Tervit H. R., Whittingham D. G., Rowson L. E. A.*: Successful culture in vitro of sheep and cattle ova. *J. Reprod. Fert.* 1972, 30, 493-497.
42. *Xu K. P., Yadav B. R., Rorie R. W., Plante L., Betteridge K. J., King W. A.*: Development and viability of bovine embryos derived from oocytes matured and fertilized in vitro and cocultured with bovine oviductal epithelial cells. *J. Reprod. Fert.* 1992, 94, 33-43.
43. *Yamada S., Shimazu Y., Kawaji H., Nakazawa M., Naito K., Toyoda Y.*: In vitro maturation and fertilization of preovulatory oocytes. *J. Reprod. Fert. Suppl.* 1993, 47, 227-229.
44. *Yamada S., Shimazu Y., Kawaji H., Nakazawa M., Naito K., Toyoda Y.*: Maturation, Fertilization and Development of Dog Oocytes In Vitro. *Biol. Reprod.* 1992, 46, 853-858.