

Wybrane biotechniki rozrodu stosowane eksperymentalnie w hodowli psów

ANNA MARIA DUSZEWSKA, URSZULA BAUMGART,
MAŁGORZATA KUNOWSKA-SŁÓSZARZ*

Zakład Embriologii Doświadczalnej IGiHZ PAN w Jastrzębcu, ul. Postępu 1, 05-552 Wólka Kosowska

*Katedra Szczegółowej Hodowli Zwierząt Wydziału Nauk o Zwierzętach SGGW, ul. Ciszewskiego 8, 02-786 Warszawa

Duszewska A. M., Baumgart U., Kunowska-Słószarz M.

Selected reproductive biotechniques used in dog breeding

Summary

Out of numerous reproductive biotechniques applied in domestic animals, as far as dogs are concerned, it was only possible to obtain *in vitro* embryos, and to clone a dog, though the results are still unsatisfactory. Until now, transferring *in vitro* embryos to bitches has produced no offspring. Paradoxically, it has been possible to obtain puppies by cloning. In contrast to farm animals and primates, the problem with obtaining *in vitro* dog embryos results from the enormous role of the bitch's oviduct especially during oocyte maturation as well as fertilisation and early embryo development. For this reason, it is very difficult to optimise *in vitro* conditions, and the adoption of *in vitro* procedures used in others species is ineffective. Therefore, it is necessary to undertake detailed studies of the dog's procreation physiology and the functions of different elements of the environment of maturing oocytes, and developing embryos, as well as the factors affecting these processes.

Keywords: maturation, fertilisation, development, embryo, *in vitro*, cloning, dog

Z wielu biotechnik rozrodu stosowanych u zwierząt gospodarskich (uzyskiwanie zarodków *in vitro*, klonowanie, tworzenie osobników transgenicznych oraz chimer), u psów udało się jedynie otrzymać zarodki *in vitro* oraz sklonować psa, choć obie te biotechniki są nadal w fazie eksperymentalnej (21).

Uzyskiwanie zarodków *in vitro* może być stosowane w rozrodzie wspomaganym u psów, gdy w inny sposób nie można otrzymać potomstwa. Dużym wyzwaniem jest ratowanie osobników zagrożonych wyginięciem, jak chociażby australijskich psów dingo. Zupełnie nowym kierunkiem jest natomiast tworzenie osobników odpornych bądź podatnych na określone jednostki chorobowe. Szacuje się, że istnieje ponad 370 chorób genetycznych dotyczących psy, wśród których wiele przypomina te występujące u ludzi. Dlatego procedura uzyskiwania *in vitro* zarodków psów może być wykorzystana jako model do badań medycznych. Wielkie nadzieje budzi perspektywa stworzenia psów nie wywołujących alergii u ludzi, zwłaszcza, że udało się tego dokonać u kotów (5, 9, 13, 21).

Uzyskiwanie zarodków *in vitro* obejmuje dojrzewanie oocytów *in vitro*, zapłodnienie *in vitro* oraz hodowlę zarodków *in vitro*. Otrzymane tą drogą zarodki mogą być przeniesione do macicy suki lub zostać zamrożone (21). O ile do tej pory potomstwo po przeniesieniu zarodków *in vitro* otrzymano u wielu gatun-

ków zwierząt gospodarskich (3), laboratoryjnych oraz człowieka, to u psów badania w tym kierunku nie przyniosły zadowalających wyników. Paradoksalnie, szczenięta otrzymano po przeniesieniu do bioczyń zarodków uzyskanych w wyniku klonowania somatycznego (6, 10).

Problem z uzyskaniem zarodków *in vitro* u psów może wynikać z ogromnej roli, jaką pełni jajowód podczas dojrzewania oocytów, zapłodnienia oraz wczesnego rozwoju zarodków. Z tego też powodu o wiele trudniej zoptymalizować warunki *in vitro*, a przystosowanie procedury uzyskiwania zarodków *in vitro* wykorzystywanej u innych gatunków jest nieskuteczne, ponieważ różnice są zbyt duże (21).

W przeciwieństwie do zwierząt gospodarskich oraz naczelnych, oocyty suk dojrzewają w jajowodzie, a nie w pęcherzyku jajnikowym, co więcej – w obecności podwyższonego poziomu progesteronu, a nie estrogenów. Poszczególne odcinki jajowodu mogą różnić się między sobą pod względem rodzaju komórek wydzielniczych oraz wydzielanych przez nie substancji, co może wpływać zarówno na dojrzewanie oocytów, jak i na zapłodnienie oraz wczesny rozwój zarodków (1, 11, 21).

U suk podczas owulacji uwalniane są niedojrzałe oocyty (w profazie pierwszego podziału mejotycznego), w przeciwieństwie do samic innych gatunków,

u których owulowane są dojrzałe oocyty (w metafazie drugiego podziału mejotycznego). Dopiero po około 44 godzinach przebywania w jajowodzie niedojrzałe oocyty podejmują przerwana mejozę. Najwcześniej dojrzałe oocyty obserwowane są około 54 godzin od owulacji. Mimo kilkugodzinnej obecności dojrzałych oocytów i plemników w jajowodzie, do zapłodnienia dochodzi znacznie później – około 83, a nawet 110-120 godzin po owulacji (7, 21). *In vivo* plemnik rzadko wnika do niedojrzałego oocytu. Przypuszczalnie ma to związek z obecnością komórek jajowodu, które zapobiegają kapacytacji, choć nie mają wpływu na żywotność plemników, zachowujących zdolność do zapłodnienia jeszcze przez 11 dni po kopulacji (7).

U suk bardzo trudno jest określić tempo rozwoju zarodków. Według niektórych autorów, zygoty obserwowane są między 72. a 96. godziną, a według innych między 94. a 124. godziną (2, 18, 21). Sprzeczności dotyczą również późniejszych stadiów. W stadium 8 blastomerów dochodzi do przejęcia kontroli przez genom zarodkowy. Do stadium moruli, czyli przez 6-7 dni, zarodki przebywają w jajowodzie, a następnie przechodzą do macicy (5, 18).

Badania nad uzyskaniem zarodków *in vitro* u psa mają już 30 lat i zostały zapoczątkowane w 1976 r. przez Mahi i Yanagimachi (12). W pierwszych doświadczeniach u 25% oocytów obserwowano wznowienie mejozy i osiągnięcie metafazy drugiego podziału, natomiast ich penetrację przez plemniki u 70% dojrzałych oocytów. Od tego czasu nie udało się dokonać dużego postępu, przeciętnie tyle samo oocytów kończy dojrzewanie *in vitro* (21) i tylko w sporadycznych przypadkach obserwowany jest rozwój zarodków po dojrzewaniu i zapłodnieniu *in vitro* (4, 15, 19, 22).

Od suk oocyty można pozyskać stosując wycięcie jajowodu i przepłukanie jego światła. Jednakże jest to trudne, ponieważ ściana jajowodu jest cienka, a jego światło małe. Innym sposobem jest kolekcja oocytów przez skrawanie jajników usuniętych przy zabiegu sterylizacji. Można też aspirować oocyty z pęcherzyków widocznych na powierzchni jajnika. Laparoskopowe pozyskiwanie oocytów od suk nie jest wykonywane ze względu na obecność kieszonki jajnikowej (21). Największą liczbę oocytów można uzyskać od suk w wieku od roku do sześciu lat. Jakkolwiek nie wykazano różnic wynikających z rasy suki (22), to jednak mieszańce są w stanie dostarczyć więcej oocytów (21).

Dane na temat wpływu fazy cyklu płciowego na zdolność dojrzewania oocytów są sprzeczne, wydaje się jednak, że oocyty uzyskane w fazie estrus lub proestrus dojrzewają częściej niż te pochodzące z innych faz (8, 16).

Do dojrzewania *in vitro* pobierane są oocyty o średnicy minimum 100-120 μm (14, 15). Czas inkubacji oocytów, niezbędny do uzyskania dojrzałości do zapłodnienia, wynosi od 48 do 72 godzin (ze sporymi odchyleniami od tych wartości) (18). Według niektórych badaczy, optymalny okres wynosi 48 godzin (co

przekłada się również na lepsze wyniki rozwoju zarodkowego po zapłodnieniu *in vitro*), a dłuższy czas nie tylko nie wpływa na ilość dojrzałych oocytów, ale może również przyczynić się do wzrostu przypadków ich degeneracji (17, 21).

Kolejnym etapem tworzenia zarodków *in vitro* jest zapłodnienie. W celu zapłodnienia plemniki muszą przejść proces kapacytacji oraz reakcję akrosomalną. Oba te procesy są niezbędne, aby plemnik mógł penetrować osłonkę przejrzystą oocytu. Opracowano techniki pozwalające na uzyskanie tych dwóch zjawisk w warunkach *in vitro* (5).

Badania *in vitro* wykazały, że w większości przypadków plemnik wnika do dojrzałego oocytu choć może on również penetrować niedojrzały oocyt. Taki niedojrzały oocyt podejmuje przerwana mejozę, co może sugerować, że plemnik jest czynnikiem aktywującym (20). Wniknięcie plemnika do niedojrzałego oocytu o wiele częściej prowadzi do polispermii (6-59%) (22).

Techniką pozwalającą na zapłodnienie nasieniem o bardzo małej koncentracji czy ruchliwości plemników jest wprowadzenie plemnika lub jego główki do ooplazmy komórki jajowej (ICSI – intracytoplasmic sperm injection). Próby zastosowania tej techniki u psów na razie przynoszą znikome efekty, bo przedjądrza obserwowano zaledwie w 8% oocytów, co więcej, w żadnym z tych przypadków nie doszło do bruzdkowania zarodków (21).

Ostatnim etapem jest hodowla zarodków *in vitro* od stadium zygoty do blastocysty. U psów nie udało się do tej pory opracować powtarzalnego systemu hodowli zarodków *in vitro*. Zapłodniony oocyt osiąga stadium 2 blastomerów w 48 godzin od zapłodnienia, a stadium 8 blastomerów w 72 godziny. W tym stadium dochodzi do zahamowania rozwoju zarodków w warunkach *in vitro*, czyli do wystąpienia tzw. bloku, który przypada na moment przejęcia kontroli nad dalszym rozwojem przez genom zarodkowy. Rodrigues i wsp. (19) obserwowali rozwój zarodkowy w zaledwie 10% zygot, z czego żaden zarodek nie rozwinął się powyżej 8 blastomerów. Songsasen i wsp. (22) uzyskali zaledwie siedem zarodków (2-12-blastomerowych) po zapłodnieniu 85 oocytów. Tylko w nielicznych przypadkach zarodki osiągają stadium blastocysty. Otoi i wsp. (14, 15) poddali zapłodnieniu 217 oocytów *in vitro* i uzyskali tylko jedną blastocystę.

Ze względu na mały postęp w uzyskiwaniu blastocyst *in vitro* również badania nad ich transferem i mrożeniem są ograniczone. Do tej pory nie udało się otrzymać szczeniąt po transferze zarodków uzyskanych *in vitro*. W literaturze zanotowano jeden przypadek przeniesienia blastocysty *in vitro* do bioczyni, jednak nie uzyskano szczenięcia (14, 15). Podejmowano również próby przeniesienia zarodków *in vitro* we wcześniejszych stadiach. Po transferze zygot i dwukomórkowych zarodków zanotowano jeden przypadek ciąży (wykrytej za pomocą USG po 20 dniach od transferu), jed-

nakże suka poroniła już w dwa dni po jej rozpoznaniu (4).

Wraz z rozwojem badań nad uzyskiwaniem zarodków psów *in vitro* postępował rozwój metod kriokonserwacji oocytów oraz zarodków. O ile na szeroką skalę mrozi się i przechowuje nasienie psów, o tyle prace nad mrożeniem lub też witrifikacją oocytów oraz zarodków nie przyniosły jeszcze pożądanych efektów (21, 23).

Ogromnym sukcesem było uzyskanie w 2005 roku psa w wyniku klonowania somatycznego. Dokonano tego za pomocą przeszczepu jądra komórki somatycznej do wyjądrzonego oocytu (SCNT – somatic cell nuclear transfer). W pierwszym etapie tych badań z ucha psa – charta afgańskiego – pobrano fragment tkanki przy pomocy biopsji, a następnie wyizolowano z niej fibroblasty (dawcy jąder do klonowania). Po krótkotrwałej hodowli fibroblasty zamrożono i przechowywano w ciekłym azocie. W kolejnym etapie od suk pobrano dojrzałe oocyty i usunięto z nich płytki metafazalne II podziału meiotycznego (biorcy jąder komórkowych). Następnie do wyjądrzonych oocytów pod osłonkę przejrzystą wprowadzano fibroblasty. Tak powstałe pary fuzjowano i aktywowano. Zrekonstruowane zarodki (1095) przeniesiono do biorczyń rasy labrador (123). Po 22 dniach stwierdzono trzy ciąży, jednak tylko jedna z nich zakończyła się powrotem, czyli urodzeniem szczenięcia – charta afgańskiego, któremu dano na imię Snuppy (Seoul National University Puppy). Snuppy ważył 530 g i nie przejawiał żadnych nieprawidłowości rozwojowych i zdrowotnych (10).

Dwa lata później Jang i wsp. (6) uzyskali klon złożony z trzech suczek identycznych fenotypowo i genotypowo z dawką komórek (chart afgański). Do klonowania zastosowano identyczną metodę, jak w przypadku Snuppy'ego, czyli przeszczepu jąder komórek somatycznych. Uzyskane w wyniku klonowania zrekonstruowane zarodki (167) przeniesiono do jajowodów 12 suk znajdujących się w odpowiedniej fazie cyklu rozrodczego. Po 23 dniach wykryto ciąży u kilku suk, które monitorowano za pomocą USG co 2 tygodnie. Otrzymano trzy zdrowe suczki o wagach 520, 469 i 520 g, które nie wykazywały żadnych zaburzeń.

U psów stosowane jest obecnie uzyskiwanie zarodków *in vitro* oraz klonowanie. Pozostałe możliwości oferowane przez biotechnologię rozrodu nie są wykorzystywane, a przynajmniej na razie nie ma na ten temat żadnych wiarygodnych doniesień. Jednak zainteresowanie się tymi aspektami biotechnologii rozrodu psa jest tylko kwestią czasu, podobnie jak kwestią czasu jest poprawienie wyników i sukces w uzyskiwaniu zarodków *in vitro*. Sukces wiąże się ściśle z dalszym poznawaniem fizjologii rozrodu psów, funkcji jaką pełnią poszczególne elementy środowiska otaczającego dojrzewające oocyty i rozwijające się zarodki oraz wpływających na te procesy czynników i właśnie w tym kierunku powinny iść kolejne badania.

Piśmiennictwo

1. 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.
2. Bysted B. V., Dieleman S. J., Hyttel P., Grece T.: Embryonic developmental stages in relation to the LH peak in dog. *J. Reprod. Fertil* 2001, 57, (Suppl) 181-186.
3. Duszewska A. M., Reklewski Z.: Uzyskiwanie zarodków zwierząt gospodarskich *in vitro*. *Medycyna Wet.* 2007, 63, 1522-1525.
4. England G. C. W., Versteegen J. P., Hewitt D. A.: Pregnancy following *in vitro* fertilization of canine oocytes. *Vet. Rec.* 2001, 148, 20-22.
5. Farstad W.: Current state in biotechnology in canine and feline reproduction. *Anim. Reprod. Sci.* 2000, 60-61, 375-387.
6. Jang G., Kim M. K., Oh H. J., Hossein M. S., Fibrianto Y. H., Hong S. G., Park J. E., Kim J. J., Kim H. J., Kang S. K., Kim D. Y., Lee B. C.: Birth of viable female dogs produced by somatic cell nuclear transfer. *Theriogenology* 2007, 67, 941-947.
7. Kawakami E., Kashiwagi C., Hori T., Tsutsui T.: Effects of canine oviduct cells on movement and capacitation of homologous spermatozoa *in vitro*. *Anim. Reprod. Sci.* 2001, 68, 121-131.
8. 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 estrus cycle. *J. Vet. Sci.* 2004, 5, 253-258.
9. Kirkness E. F., Bafna V., Halpern A. L., Levy S., Remington K., Rusch D. B., Delcher A. L., Pop M., Wang W., Fraser C. M., Venter J. C.: The dog genome: survey sequencing and comparative analysis. *Science* 2003, 301, 1898-1903.
10. Lee B. C., Kim M. K., Jang G., Oh H. J., Yuda F., Shamim H., Kim J. J., Kang S. K., Schatten G., Hwang W. S.: Dogs cloned from adults somatic cells. *Nature* 2005, 436, 641.
11. 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.
12. Mahi C. A., Yanagimachi R.: Maturation and sperm penetration of canine ovarian oocytes *in vitro*. *J. Exp. Zool.* 1976, 196, 189-196.
13. Ostrander E. A., Kruglyak L.: Unleashing the canine genome. *Genome Res.* 2000, 10, 1271-1274.
14. Otoi T., Fujii M., Tanaka M., Ooka A., Suzuki T.: Canine oocyte diameter in relation to meiotic competence and sperm penetration. *Theriogenology* 2000a, 54, 535-542.
15. Otoi T., Murakami M., Furii M., Tanaka M., Ooka A., Une S., Suzuki T.: Development of canine oocytes matured and fertilized *in vitro*. *Vet. Rec.* 2000b, 146, 52-53.
16. Otoi T., Ooka A., Murakami M., Kurniani Karja N. W., Suzuki T.: Size distribution and meiotic competence of oocytes obtained from bitch ovaries at various stages of the oestrous cycle. *Reprod. Fertil. Dev.* 2001, 13, 151-155.
17. Otoi T., Shin T., Kraemer D. C., Westhusin M. E.: Influence of maturation culture period on the development of canine oocytes after *in vitro* maturation and fertilization. *Reprod. Nutr. Dev.* 2004, 44, 631-637.
18. Reynaud K., Fontbonne A., Marseloo N., Thoumire S., Chebrou M., de Le-segno C. V., Chastant-Maillard S.: *In vitro* meiotic resumption, fertilization and early embryonic development in the bitch. *Reproduction* 2005, 130, 193-201.
19. 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.
20. Saint-Dizier M., Salomon J. F., Petit C., Renard J. P., Chastant-Maillard S.: *In vitro* maturation of bitch oocytes: effect of sperm penetration. *J. Reprod. Fertil.* 2001, 57 (Suppl.), 147-150.
21. 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.
22. Songsasen N., Yu I., Leibo S. P.: Nuclear maturation of canine oocytes cultured in protein-free media. *Mol. Reprod. Dev.* 2002, 62, 405-415.
23. Tsutsui T., Hori T., Endo S., Hayama A., Kawakami E.: Intrauterine transfer of early canine embryos. *Theriogenology* 2006, 66, 1568-1572.