

Metody pozyskiwania, oceny i selekcji oocytów psa domowego

MAŁGORZATA KUNOWSKA-SŁÓSZARZ, URSZULA BAUMGART, AGNIESZKA BORUTA

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

Otrzymano 22.08.2013

Zaakceptowano 27.09.2013

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

Methods of collection, evaluation and selection of domestic dog oocytes

Summary

As a consequence of the untypical characteristics associated with the reproductive physiology of dogs the research on the IVP in this species has not been effective. The whole IVP procedure is preceded by a stage of oocytes collection, the quantity and quality of which may in the future affect the number and ability of the development of embryos. In the presented paper methodologies used in the collection, evaluation and selection of oocytes in dogs are summarised.

Keywords: dog, oocytes collection, oocytes evaluation, oocytes selection

Rozwój badań nad rozrodem wspomaganym u psów związany jest w dużej mierze ze szczególnym miejscem tych zwierząt w życiu człowieka. Dziś pies jest przez wielu postrzegany jako członek rodziny ludzkiej, a często również jako jedyny partner i towarzysz zapracowanych singli. W związku z tym, że psy żyją jednak krótko, człowiek poszukuje metod, które pozwoliłyby to życie przedłużyć lub stara się uzyskać potomstwo po szczególnie cennych osobnikach (nie zawsze cennych za sprawą wyjątkowej puli genetycznej, eksterieru czy ocenionej wartości hodowlanej). Zainteresowanie wspomaganie rozrodu wynika również z poszukiwania nowych rozwiązań, zwłaszcza w sytuacjach, gdy w sposób naturalny nie ma innej możliwości otrzymania potomstwa od suk (np. niemożność donoszenia ciąży). Innym ważnym aspektem rozwoju biotechnik związanych z reprodukcją psów jest troska o zachowanie zagrożonych wyginięciem gatunków, a także eliminacja z populacji genów warunkujących pojawianie się wad genetycznych (tylko zarodki potencjalnie wolne od mutacji genetycznych będą docelowo przenoszone do biorczyń) (3). Kompleksową, biotechnologiczną metodą wspomagającą rozród tych zwierząt w połączeniu z embriotransferem jest uzyskiwanie zarodków w warunkach laboratoryjnych (IVP – in vitro production).

Technika uzyskiwania zarodków *in vitro* u psów znajduje się nadal w fazie eksperymentalnej ze względu na trudności z ustaleniem optymalnych warunków dla tej procedury. Dzieje się tak z wielu powodów, począwszy od ograniczeń w naszej wiedzy, kończąc na

nietyposwej charakterystyce rozrodu wszystkich psowatych: odmienne środowisko hormonalne towarzyszące owulacji, dojrzewaniu oocytów i zapłodnieniu oraz nietyposwy wzorzec samego dojrzewania. Elementy te w sposób szczególny rzutują na rozwój zarodkowy i sprawiają, że nie da się w sposób prosty zaimplementować metodyki stosowanej u innych gatunków zwierząt. Na efektywność procedury uzyskiwania zarodków *in vitro* (czyli na liczbę uzyskanych zarodków i efekty transferu do surogatki) poza warunkami panującymi w czasie poszczególnych etapów wpływają również liczba i jakość pozyskanych oocytów.

Oocyty pozyskuje się przyżyciowo, najczęściej podczas wykonywanej zgodnie z zasadami sztuki owariorhisterektomii. Wprawdzie po sterylizacji suka nie będzie mogła mieć już potomstwa w sposób naturalny, ale takie działanie pozwala na pobranie i manipulowanie znacznie większą liczbą komórek jajowych niż w przypadku innych metod. Zabiegi takie w chwili obecnej są wykonywane głównie w celu opracowania procedury IVP i nie są powszechną praktyką w hodowli psów.

Co prawda, istnieje również możliwość przeprowadzenia laparoskopii zaraz po owulacji, ale jest to procedura bardzo trudna i wykorzystywana bardzo rzadko (10). Owariorhisterektomia jest zabiegiem wykonywanym w znieczuleniu ogólnym. Wybiera się zwierzęta dojrzałe płciowo w wieku od 1 do 6-8 lat, ponieważ od suk w średnim wieku oraz od suk młodych, dojrzałych płciowo można pozyskać najwięcej oocytów. Mimo że u młodych zwierząt odnajduje się mniejszą

liczbę pęcherzyków jajnikowych, to prawdopodobnie ze względu na stosunkowo częste zjawisko występowania więcej niż jednego oocytu w pęcherzyku liczba możliwych do pozyskania COCs (kompleksów oocyt-komórki ziarniste wzgórka jajonośnego) jest taka sama, jak u suk starszych (11).

Moment przeprowadzenia zabiegu (faza cyklu płciowego) zależy od celu badania, zatem nie zawsze dokonuje się kolekcji w fazie *oestrus*, wiele jednak wskazuje na to, że faza cyklu płciowego ma wpływ na kompetencje rozwojowe oocytu. Chociaż można się spotkać ze sprzecznymi doniesieniami (26), wielu autorów twierdzi, że faza *proestrus* i *oestrus* są zdecydowanie bardziej korzystne dla dojrzewania komórek jajowych (ze szczególnym wskazaniem na *oestrus*), natomiast oocyty pozyskane od suk będących w *anoestrus* są niezdolne do osiągnięcia dojrzałości *in vitro* (28). Może mieć to związek z obecnością sieci połączeń zwanych złączami szczelinowymi (gap-junction; GJ) pomiędzy komórkami ziarnistymi wzgórka jajonośnego a oocytem. Za ich pośrednictwem do oocytu dostarczane są składniki odżywcze, jony i substancje o właściwościach regulatorowych, które wpływają na cykl komórkowy (11). GJ mają duże znaczenie dla wznowienia przerwanej podziału mejotycznego, a jak dowiedziono, w oocytach pobranych w *anoestrus* sieć ta praktycznie nie funkcjonuje (13). Z kolei doniesienia Songsasen i Wildt (26) mówią o wyraźnym wpływie wielkości samego pęcherzyka jajnikowego, z którego pozyskiwany jest oocyt. Autorzy podzielili pozyskane przez skrawanie kory jajnika duże oocyty na grupy pod względem wielkości pęcherzyków jajnikowych, z których pochodziły, miesiąca (aby zweryfikować tezę o wpływie pory roku na kompetencje rozwojowe oocytu) i fazy cyklu płciowego. Wyniki tego konkretnego doświadczenia dowiodły, że to wielkość pęcherzyka jajnikowego jest najistotniejszym czynnikiem, aż 79,5% oocytów osiągnęło stadium metafazy II (MII) (26). Oczywiście jest, że istnieje związek pomiędzy wielkością pęcherzyka a stadiem cyklu reprodukcyjnego, a więc wyniki tego eksperymentu nie podważają stwierdzenia, że momentami najbardziej sprzyjającymi pobieraniu oocytów do IVM są *proestrus* i *oestrus*. Sami autorzy potwierdzają wpływ fazy cyklu reprodukcyjnego na wielkość i dystrybucję pęcherzyków jajnikowych (26). Wydaje się, że w przypadku oocytów psich ma się do czynienia z takimi samymi mechanizmami regulującymi cykl komórkowy, jak w przypadku innych gatunków, ale wiele wskazuje na to, że w oocytach pochodzących z mniejszych pęcherzyków mechanizmy te nie funkcjonują właściwie (26).

W badaniach, które wymagają pobrania oocytów zaraz po owulacji (zazwyczaj wtedy, gdy celem jest nie tylko zapłodnienie i hodowla zarodków *in vitro*, ale również dojrzewanie oocytów *in vitro*) stosuje się dwojaki postępowanie. Pierwszym sposobem jest wykorzystanie suk wybranych tak, by przewidy-

wany moment owulacji następował u nich z bardzo niewielką różnicą w czasie. U suk tych powinny być wykonywane regularne cytologiczne badania wymazu z pochwy, które pozwalają pośrednio ocenić stopień estrogenizacji narządu płciowego w oparciu o budowę morfologiczną komórek nabłonkowych pobranych z pochwy. Pod koniec *proestrus* i podczas *oestrus* komórki warstwy powierzchniowej ulegają keratynizacji. Jeśli odsetek takich komórek osiąga 70-100%, świadczy to o wystąpieniu *oestrus* (17). Ocena obrazu cytologicznego wymazu z pochwy często potwierdzana jest równoległym oznaczaniem progesteronu w osoczu krwi (16, 24). Niżański (16) podaje, że w czasie przedowulacyjnego wyrzutu LH dochodzi do wyraźnego wzrostu stężenia progesteronu do wartości wynoszących 1-3 ng/ml, by podczas owulacji osiągnąć 1-8 ng/ml. W tym celu Hewitt i England (6) pobierali próbki krwi z żyły odpromieniowej lub szyjnej do probówek zawierających heparynę (Monovette-Starstedt). Następnie oddzielano osocze poprzez 10-minutowe wirowanie z przyspieszeniem 3500 g w temperaturze 4°C. Oznaczenia koncentracji progesteronu dokonywano za pomocą dostępnego na rynku testu ELISA (Univet) (6). Wykorzystywane są nie tylko testy immunoenzymatyczne, ale również radioimmunologiczny (np. wykorzystany przez Jang i wsp. (10) DSL-3900 ACTIVE® Diagnostic Systems Laboratories). Oba te badania pozwalają określić przybliżony moment wystąpienia owulacji, jednak są metodami czasochłonnymi i kosztownymi.

Dla celów praktycznych w wyznaczaniu dnia zerowego cyklu rujowego stosowane są również oznaczenia stężenia hormonu LH we krwi. Zwykle na przełomie fazy *proestrus* i *oestrus* u suk ma miejsce przedowulacyjny wyrzut hormonu LH z przysadki mózgowej, którego stężenie wzrasta z 2-4 ng/ml do 20-40 ng/ml. Dzień, w którym LH osiąga maksymalne wartości, uznawany jest za początek cyklu rujowego, a owulacja pojawia się około dwa dni po najwyższych wartościach stężenia tego hormonu (16). Podobnie jak w przypadku pomiaru koncentracji progesteronu, do celów diagnostycznych wykorzystywane są testy RIA lub ELISA.

Metodami pomocniczymi w wyznaczeniu odpowiedniej fazy cyklu mogą być również: badania ultrasonograficzne, wagnoskopia, pomiary oporności śluzu pochwowego lub zmiany stopnia krystalizacji śluzu pochwowego (17).

Innym wyjściem jest farmakologiczne wywołanie owulacji (istnieje jednak przypuszczenie, że nienaturalne warunki towarzyszące wzrostowi oocytów w pęcherzykach jajnikowych mogą rzutować na IVM). Wykorzystali ją Yamada i wsp. (29) (którzy uzyskali zarodek 8-komórkowy) oraz England i wsp. (5) (którym w wyniku procedury *in vitro* udało się uzyskać ciążę). Yamada i wsp. (29) wykonywali codzienne iniekcje, podając zwierzętom 100-400 µg estronu, aż do momentu pojawienia się wypływu z pochwy. Po

trzech dniach, w formie iniekcji podskórnej, podano eCG w ilości 400 UI i hCG w ilości 1000 UI, a po kolejnych trzech i czterech dniach 10 µg estradiolu domięśniowo. Moment rozpoczęcia fazy *oestrus* określono w oparciu o regularne badania cytologiczne wymazów z pochwy (na obecność złuszczonego nabłonka) i pierwszego dnia rui podano dożylnie 1000 UI hCG. England i wsp. (5) wykorzystali natomiast iniekcje z kabergoliny do wywołania owulacji, które wykonywano codziennie przez około 12-15 dni, aż do pojawienia się krwawego wypływu. Następnie rozpoczęto przeprowadzanie regularnych badań cytologicznych wymazu z pochwy i oznaczeń koncentracji progesteronu we krwi. Zabieg owariohisterektomii przeprowadzono, gdy poziom progesteronu przekroczył 5 ng/ml.

W przypadku, gdy badanie nie wymaga pobierania oocytów w fazie *oestrus*, również przed owariohisterektomią określa się fazę cyklu. Dzieje się tak w przypadku prac ukierunkowanych na określenie różnic w kompetencji do wznowienia i ukończenia mejozy w grupie oocytów zróżnicowanej pod względem momentu pozyskania (22). Standardową procedurą dla określenia momentu owulacji jest regularne badanie wymazu z pochwy. Tu również równolegle oznacza się poziom progesteronu w osoczu krwi.

Innym sposobem jest ocena jajników bezpośrednio po owariohisterektomii. W oparciu o tę właśnie metodę Otoi i wsp. (21) klasyfikowali suki wg fazy cyklu:

- *oestrus* i *prooestrus* – gdy na jajniku widoczne były pęcherzyki o średnicy od 2 do 10 mm,
- *anoestrus* – gdy na jajniku obecna była tkanka luteinowa i nie dało się zauważyć żadnych pęcherzyków jajnikowych,
- *diestrus* – gdy można było zaobserwować więcej niż jedno ciało żółte.

W przypadku wielu badań w ogóle nie określano fazy cyklu płciowego (1, 6, 12, 19).

Jajniki po pobraniu (jeśli istnieje potrzeba przeniesienia ich do laboratorium) umieszczane są w różnego typu pożywkach (np. PBS) i ich modyfikacjach, najczęściej w temperaturze 30-35°C (19, 21). Zespół Bogliolo i wsp. (1) stosował złożony płyn, składający się z PBS, 100 µg/ml⁻¹ penicyliny G i takiej samej ilości streptomycyny o temperaturze 37°C (1). Podobnie Luvoni i wsp. (12) umieszczali jajniki w płynie złożonym zawierającym PBS z dodatkiem 100 000 UI/ml penicyliny G, 100 mg/ml streptomycyny i 250 µg/ml amfoterycyny B. Wzbogacanie pożywek do transportu czy też do pozyskiwania oocytów o antybiotyki i substancje grzybobójcze stosował również zespół Bolamba i wsp. (2) (stosując mieszanę penicyliny G, streptomycyny i amfoterycyny) oraz Hewitt i England (6). Stosowanie antybiotyków i antymykotyków w roztworach przeznaczonych do transportu ma na celu zminimalizowanie efektów skażenia próbek drobnoustrojami. Pozyskane gonady poddawane są płukaniu (zazwyczaj kilkukrotnemu) w odpowiednim płynie.

Przykładowo: może to być pozbawiony dodatków PBS (1), TCM-199 buforowany HEPESem (20) lub TYH wzbogacony o BSA (29). Inni autorzy stosują do płukania bardziej złożone pożywki, w skład których prócz surowic lub albumin surowiczych (źródło białka w pożywkach) wchodzi również hormony, antybiotyki i substancje grzybobójcze: Otoi i wsp. (19) zastosował TCM-199 z dodatkiem 5% FBS, 5 µg/ml insuliny i gentamycyną, Bolamba i wsp. (2) zaś wzbogacane PBS (10 UI penicyliny G/ml, 10 UI streptomycyny/ml i 0,024 µg amfoterycyny B).

Kolejnym krokiem jest samo pozyskanie oocytów.

Do pozyskiwania psich oocytów adaptowane są trzy metody: izolacja pęcherzyków jajnikowych, aspiracja płynu z pęcherzyków jajnikowych, skrawanie kory jajnika

Izolacja pęcherzyków jajnikowych

Wyizolowanie pęcherzyków jajnikowych z jajnika jest zazwyczaj przeprowadzane metodą enzymatyczną. Wybiera się w pełni ukształtowane pęcherzyki drugorzędowe (preantralne/APAN) i trzeciorzędowe (antralne/AN) oraz wczesne pęcherzyki trzeciorzędowe (antralne/EAN) w celu wykorzystania ich struktury do IVM (2, 3). Wybór ten podyktowany jest faktem, iż (jak dowiodły badania) zdecydowana ich większość zawiera oocyty w metafazie I podziału mejotycznego o cytoplazmie posiadającej wyraźne zaciemnienia wynikające z obecności lipidów (co jest jednym z kryteriów wyboru oocytów do IVM) (2, 3, 8, 14, 29). Ponadto, jak dowiedli Songsasen i Wildt (26), oocyty pochodzące z większych pęcherzyków jajnikowych wykazują większą zdolność do wznowienia mejozy (80% oocytów o średnicy > 2 mm wznowiło mejozę, pozyskanie oocytów z mniejszych pęcherzyków skutkowało albo bardzo niewielką liczbą wznowień mejozy, albo ich brakiem) (26).

Pierwsza część procedury przebiega tak samo, jak w przypadku pozyskiwania oocytów przez skrawanie kory jajnika: jajniki oczyszczane są z wszelkich przyległych tkanek pozostałych po zabiegu owariohisterektomii i płukane. W tym celu Durrant i wsp. (3) oraz Bolamba i wsp. (2) wykorzystali roztwory składające się z PBS, antybiotyków i antymykotyków (zbliżone składem lub takie same jak te, stosowane przy transporcie próbek do laboratorium) (Gibco, Invitrogen). Jajniki poddaje się ocenie, określając liczbę widocznych struktur i tnie na małe, 1-2 milimetrowe skrawki, które następnie inkubuje się w pożywce zawierającej enzymy. Durrant i wsp. (3) oraz Bolamba i wsp. (2) zaproponowali godziną inkubację w 37°C i mieszaną składającą się z pożywki BWW zawierającej 1000 UI kolagenazy (Sigma) oraz 75 UI deoksyrybonukleazy (Sigma). Zawiesiny te w trakcie inkubacji poddawali mieszaniu tak, aby usprawnić proces oddzielania się pęcherzyków jajnikowych. Po zakończonym procesie trawienia enzymatycznego mieszanina była filtrowana (w pracach ww. autorów

wykorzystano filtry o oczkach średnicy 35 μm firmy TETKO Inc.), a pozostały na filtrze osad zawierający pęcherzyki jajnikowe wypłukiwany pożywką BWW z 0,1% dodatkiem (wt/v) frakcji V albuminy bydziej (Sigma). Z tak powstałego roztworu za pomocą pipety pozyskiwane są pęcherzyki jajnikowe, te zaś, które mimo trawienia pozostały związane ze zbędnymi fragmentami tkanki, oczyszcza się mechanicznie. Istotne jest, by nie naruszyć integralności struktury pęcherzyków, ponieważ w niektórych rodzajach hodowli będą one stanowiły środowisko dla dojrzewającego oocyty. Do dalszych badań wybiera się pęcherzyki zawierające oocyty z kilkoma warstwami komórek ziarnistych, ciemnym wybarwieniem cytoplazmy, a w przypadku pęcherzyków antralnych – z wyraźnie widoczną jamą.

Zastosowanie metody enzymatycznej podyktowane jest chęcią uniknięcia uszkodzeń mechanicznych, które mogłyby wpłynąć na integralność struktury pęcherzyka i tym samym upośledzić jego funkcje w czasie kolejnego etapu produkcji zarodków *in vitro*. Enzymatyczna izolacja może jednak wpływać na efekty IVM. Wyniki badań, w których zastosowano tę metodę sugerują, że poddanie pęcherzyków jajnikowych procedurze inkubacji z enzymami może doprowadzić do spontanicznego wznowienia mejozy (2, 3). Autorzy określając przed rozpoczęciem procedury IVM stopień zaawansowania procesu dojrzewania do zapłodnienia, stwierdzili zdecydowanie większą liczbę oocytów GVBD – MII (około 24%) niż autorzy nie wykorzystujący inkubacji z enzymami. Hewitt i wsp. (8) zaobserwowali stadium GVBD u zaledwie 5,1% zbadanych oocytów).

Aspiracja płynu z pęcherzyków jajnikowych

Zabieg ten u dużych zwierząt może być wykonywany przyżyciowo techniką OPU wykorzystującą aparat USG z odpowiednią sondą wyposażoną w igłę punkcyjną. U psów jedynym sposobem jest aspiracja płynu pęcherzykowego z pozyskanego w czasie ovariostomii jajnika. Metoda ta jest jednak mało efektywna, co wiąże się ze specyfiką rozrodu tych zwierząt, z długim okresem zanikania rui (70-80 dni) i spoczynku płciowego (nawet do 10 miesięcy) (23), zatem przez zdecydowanie większą część cyklu na powierzchni jajnika nie można dostrzec pęcherzyków. Z kolei w fazach, w których pęcherzyki są widoczne ich niewielka średnica utrudnia, a nawet uniemożliwia skuteczne przeprowadzenie aspiracji (11). W konsekwencji liczba oocytów, jaką można pozyskać tą metodą jest niewielka (15), co czyni ją nieprzydatną.

Skrawanie kory jajnika

Jest to najczęściej wykorzystywana metoda pozyskiwania oocytów. Procedurę skrawania przeprowadza się poprzez cięcia, które uwalniają oocyty do pożywki (w temperaturze 35-37°C). Podstawą pożywek jest TCM-199 lub PBS, ewentualnie TYH. Dodaje się do nich różne substancje: BSA, FCS, HEPES (bufor),

antybiotyki (gentamycyna, streptomycyna, penicylina G). Oto składy przykładowych pożywek wykorzystywanych przy pozyskiwaniu oocytów:

- TCM-199 + 25 mM HEPES + 50 $\mu\text{g}/\text{ml}^{-1}$ gentamycyny (21),
- TCM-199 + 0,3% BSA (5),
- TCM-199 + 25 mM HEPES + 0,3% BSA (frakcja V) + 100 UI/ ml^{-1} penicyliny + 50 $\mu\text{g}/\text{ml}^{-1}$ streptomycyny + 2 mg/ ml^{-1} wodorowęglanu sodu (6),
- PBS + 1% FCS (22),
- PBS + 100 $\mu\text{g}/\text{ml}^{-1}$ penicyliny G + 100 $\mu\text{g}/\text{ml}^{-1}$ streptomycyny (1),
- PBS + 0,1% alkoholu poliwinylowego + 100 000 UI/ml penicyliny G + 100 mg/ml streptomycyny (12),
- mPBS + 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ gentamycyny (19),
- TYH + 10% FCS inaktywowanej ciepłem + 30 mg/l gentamycyny (29) (Autor wykorzystał modyfikację metody skrawania: w celu uwolnienia COC do pożywki przeprowadził nakłuwanie pęcherzyków antralnych igłą).

Wymienione wyżej metody pozyskiwania oocytów mogą być przeprowadzane tylko na wyciętym podczas ovariostomii jajniku i w ich wyniku uzyskuje się oocyty niedojrzałe do zapłodnienia. Istnieją przypadki, w których oocyty nie są pozyskiwane na potrzeby IVM, ale np. do badań nad IVF dojrziałych oocytów lub klonowaniem. Jako że oocyty psów dojrzewają w świetle jajowodu, konieczne jest uzyskanie do niego pełnego dostępu na całej długości. W takim przypadku wybraną procedurą jest laparotomia, w czasie której wykonywane jest płukanie jajowodu – w odzyskanym po płukaniu płynie znajdują się oocyty. Pobranie oocytów w pełni dojrziałych do zapłodnienia wymaga określenia momentu owulacji, aby w odniesieniu do niego wyznaczyć optymalny moment zabiegu. W tym celu zazwyczaj stosuje się codzienne badania koncentracji progesteronu we krwi. Hori i Tsutsui (9) wykonywali je, poczynawszy od 6. dnia krwawienia towarzyszącego fazie *proestrus* i jako dzień owulacji wyznaczyli ten, w którym poziom przekroczył 2 ng/ml. W 3-4 dni po owulacji przeprowadzono laparotomię, w czasie której wykonywano płukanie jajowodu w celu pozyskania dojrziałych oocytów. Podobną metodę zastosowali Jang i wsp. (10): dokonywali codziennych obserwacji w czasie spontanicznego *estrus*, zwracając uwagę na stopień obrzęku sromu i kolor wypływu z pochwy. Dzień owulacji wyznaczono w oparciu o badanie koncentracji progesteronu we krwi (4,0-7,5 ng/ml) (test DSL-3900 ACTIVE® Diagnostic Systems Laboratories). Laparotomię wykonywano dopiero po upływie 72 godzin od chwili zanotowania zwiększonego poziomu progesteronu, biorąc pod uwagę opóźnienie dojrzewania w stosunku do momentu owulacji. Zabieg wykonywany był zgodnie z procedurami weterynaryjnymi. W czasie jego trwania do jajowodu od strony lejka wprowadzono stalową kaniulę z oliwką (18G, 7,5 cm), którą unieruchomiono, wykorzystując plastikową rurkę (3 cm długości, 2 mm średnicy) oraz

kleszczyki hemostatyczne. Drugą kaniulę (dożylna, 24G) umieszczono na wysokości połączenia macicy z jajowodem i za jej pomocą wprowadzono 10 ml pożywki TCM-199 buforowanej HEPESem (Invitrogen) i wzbogaconej 10% dodatkiem FBS (Sigma), 2 mM wodorowęglanu sodu oraz 5 mg/ml BSA (Sigma). Po wypłukaniu jajowodu płyn zawierający oocyty odzyskano przez stalową kaniulę 18G (10). Pozyskiwane w ten sposób dojrzałe *in vivo* oocyty mogą stanowić materiał do badań obejmujących IVF i IVC. Mogą być również wykorzystane do klonowania.

Kolejną czynnością przed przeprowadzeniem IVM jest ocena i selekcja pozyskanych oocytów, ponieważ w grupie tej znajdują się nie tylko oocyty przydatne, ale również nieprzydatne i zdegenerowane. Wybiera się oocyty, które posiadają minimum dwie warstwy komórek ziarnistych – obecność więcej niż dwóch nienaruszonych warstw komórek ziarnistych gwarantuje między innymi intensyfikację ekspresji genu *zp3*, odpowiedzialnego za prawidłową syntezę osłonki przejrzystej (ZP). Z kolei jej prawidłowa budowa warunkuje właściwy przebieg zapłodnienia. Oocyty, które posiadają tylko jedną warstwę komórek ziarnistych nie są zdolne do ukończenia dojrzewania i wyrzucenia ciała kierunkowego. Często również degenerują (11, 15). Posiadają cytoplazmę o właściwym, ciemnym wybarwieniu (ryc. 1) – jest ono wynikiem obecności dużej ilości kropelek lipidowych, w skład których

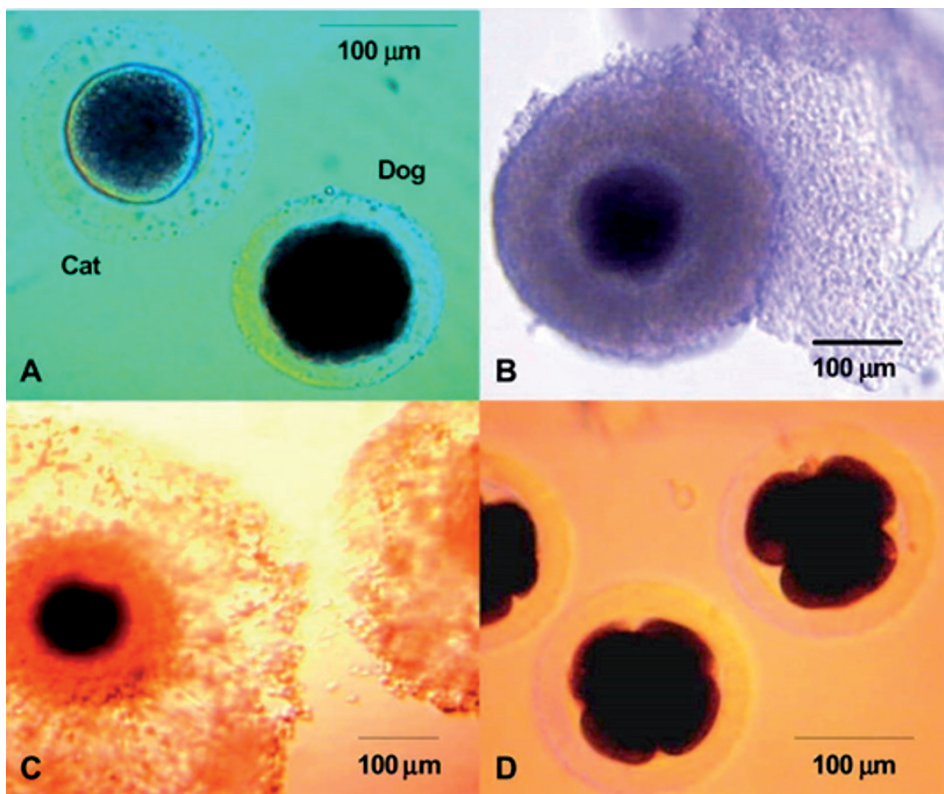
wchodzą tłuszcze nasycone, cholesterol, trójglicerydy, fosfolipidy i glikolipidy. Są one transportowane do wnętrza oocyty jeszcze w czasie wzrostu w pęcherzyku jajnikowym, a zaciemnienia, które tworzą w cytoplazmie, stanowią cechę charakterystyczną psich oocytów (25). Mają odpowiednią średnicę. Istotnym kryterium jest też średnica oocyty (mierzona bez ZP, przy użyciu mikrometru okularowego). Autorzy często podają sprzeczne informacje: jedni twierdzą, że częściej dojrzewają oocyty o średnicy większej niż 100 μm (7), inni natomiast sądzą, że niezbędna jest średnica większa niż 120 μm , a oocyty mniejsze niż 110 μm nie są w stanie ukończyć dojrzewania (18, 20). Wydaje się jednak, że znacznie częściej dojrzewają oocyty o średnicy przekraczającej 100 μm niż mniejsze, jednakże nadal nie przeprowadzono wiarygodnych badań potwierdzających tę tezę. Pochodzą z pęcherzyków jajnikowych o średnicy przekraczającej 2 mm. Jak dowodzą Songsasen i Wildt (26), na niski wskaźnik wznowień mejozy ma wpływ duża rozbieżność w wielkości pęcherzyków jajnikowych, z których pochodzą wykorzystywane do IVM oocyty. Wybór do dalszych badań oocytów z odpowiednio dużych pęcherzyków jajnikowych pozwala na osiągnięcie w badanej grupie nawet 80% wznowień mejozy, co stanowi 50% progres w stosunku do badań, w których nie wykonano takiej selekcji (27).

Hewitt i England (6) biorąc pod uwagę dwa z powyższych kryteriów, przyporządkowali oocyty do następujących klas:

1. oocyty otoczone co najmniej jedną warstwą komórek ziarnistych, których cytoplazma jest wyraźnie ciemna,
2. oocyty, których cytoplazma jest lekko wybarwiona, a warstwy komórek ziarnistych nie są pełne,
3. oocyty pozbawione komórek ziarnistych, o pozbawionej zaciemnień cytoplazmie.

Do badań wykorzystywane są jedynie oocyty należące do klasy pierwszej. Większość autorów przyjmuje ten system jako podstawę selekcji oocytów. Czasami jednak głównym kryterium selekcyjnym jest średnica oocyty. Na przykład Oto i wsp. (21) wybierali wyłącznie oocyty o średnicy przekraczającej 110 μm , co pozostaje w zgodzie z jego opinią na temat kompetencji tych oocytów do ukończenia dojrzewania.

Podsumowując można stwierdzić, że etap przygotowawczy, rozpoczynający procedurę *in vitro*, polegający na pozyskiwaniu



Ryc. 1. Oocyt psa oraz towarzyszące mu warstwy komórek ziarnistych i widoczne ciemne wybarwienie cytoplazmy (Songsasen i Wildt, 2007)

Objaśnienia: A) porównanie oocyty psa i oocyty kota domowego; B) oocyt psa otoczony warstwami komórek ziarnistych; C) oocyt psa po trwającej 48 godzin inkubacji w pożywce zawierającej bydłą somatotropinę; D) zarodki psa w 48 godzin od inseminacji, uzyskane w wyniku dojrzewania oocytów *in vitro*

od suk komórek jajowych może nastęrczać wiele trudności, począwszy od konieczności stwierdzenia u samicy odpowiedniego stadium cyklu, poprzez wykonanie zabiegu owariohisterektomii, wyboru metody pozyskania oocytów, aż do oceny i selekcji tych komórek.

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. *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.
3. *Chastant-Maillard S., Chebrouit M., Thoumire S., Saint-Dizier M., Chodkiewicz M., Reynaud K.*: Embryo biotechnology in dog: a review. *Rev. Bras. Reprod. Anim. Supl. Belo Horizonte* 2009, 6, 125-132.
4. *Durrant B. S., Pratt N. C., Borden K. D., Bolamba D.*: Isolation and characterization of canine advanced preantral and early antral follicles. *Theriogenology* 1998, 49, 917-932.
5. *England G. C. W., Verstegen J. P., Hewitt D. A.*: Pregnancy following in vitro fertilization of canine oocytes. *Vet. Rec.* 2001, 148, 20-22.
6. *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.
7. *Hewitt D. A., England G. C. W.*: The effect of oocyte size and bitch age upon oocyte nuclear maturation in vitro. *Theriogenology* 1998, 49, 957-966.
8. *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.
9. *Hori T., Tsutsui T.*: In vitro fertilization of mature canine ova. *Vet. Rec.* 2003, 152, 688-690.
10. *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.
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. *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.
13. *Luvoni G. C., Luciano A. M., Modena S., Gandolfi F.*: Influence of different stages of the estrous cycle on cumulus-oocyte communications in canine oocytes, effects on the efficiency of in vitro maturation. *J. Reprod. Fert. Suppl.* 2001, 57, 141-146.
14. *Mahi C. A., Yanagimachi R.*: Maturation and sperm penetration of canine ovarian oocytes in vitro. *J. Exp. Zoology* 1976, 196, 189-196.
15. *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.
16. *Niżański W.*: Ustalanie optymalnego terminu krycia i sztucznej inseminacji suk. Cz. I. Wskazania, wywiad, badanie kliniczne, oznaczenie stężenia progesteronu i LH. *Weterynaria w praktyce* 2004, 1, 6-10.
17. *Niżański W.*: Ustalanie optymalnego terminu krycia i sztucznej inseminacji suk. Cz. II. *Weterynaria w praktyce* 2004, 2, 29-34.
18. *Otoi T., Fujii M., Tanaka M., Ooka A., Suzuki T.*: Canine oocyte diameter in relation to meiotic competence and sperm penetration. *Theriogenology* 2000, 54, 535-542.
19. *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.
20. *Otoi T., Ooka A., Murakami M., Kurniani N., Karya W., Suzuki T.*: Size distribution and meiotic competence of oocytes obtained from bitch ovaries at various stages of oestrous cycle. *Reprod. Fert. Dev.* 2001, 13, 151-155.
21. *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.
22. *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.
23. *Ściesiński K.*: Hodowla psów. *SGGW* 2004, 198-207.
24. *Ściesiński K.*: Rozród psa. Cz. II. *Pies* 1989, 270, 18-19.
25. *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.
26. *Songsasen N., Wildt D. E.*: Size of the donor Follicle, but not Stage of Reproductive Cycle or Seasonality Influences Meiotic Competency of Selected Domestic Dog Oocytes. *Mol. Reprod. Dev.* 2005, 72, 113-119.
27. *Songsasen N., Yu I., Leibo S. P.*: Nuclear maturation of canine oocytes cultured in protein-free media. *Mol. Reprod. Dev.* 2002, 62, 407-415.
28. *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.
29. *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.

Adres autora: dr inż. Małgorzata Kunowska-Słószarz, ul. Ciszewskiego 8, 02-786 Warszawa; e-mail: malgorzata_kunowska_slosarz@sggw.pl