

Włodarczyk R., Bukowska D., Jaśkowski J.M.,
Department of Veterinary, Poznań University of Life
Sciences

The purpose of detailed studies of canine reproduction resulted from assisted reproductive technologies (ART), with a special consideration of embryos *in vitro* production (IVP) and embryos transfer (ET). Development of these methods enabled animals with different disorders to reproduce and also the IVP procedures elaborated for dogs could enhance the use of ART in reproduction and preservation of rare, wild species from *Canidae* family: *Alopex lagopus*, *Canis aureus*, *Canis latrans* and *Canis lupus*. Currently, major subject of research in this field is conditions optimization during *in vitro* maturation of bitch oocytes. Numerous molecular biology experiments were performed to establish localization of synthesis of important proteins and expression of genes, necessary for nuclear maturation processes. Also, studies on the canine oocyte ultrastructure, playing important role in cytoplasmic maturation, were carried out. Results of conducted studies were presented and discussed.

Keywords: bitch, oocytes, ultrastructure.

Celem szczegółowych badań dążących do poznania biologii rozrodu psów jest przede wszystkim rozwój biotechnik rozrodu tego gatunku, ze szczególnym uwzględnieniem pozyskiwania zarodków *in vitro* (*in vitro* production – IVP) oraz przeniesienia zarodków (embriotransfer – ET). Rozwój tych metod pozwoliłby na rozmnażanie zwierząt z zaburzeniami rozrodu, natomiast zastosowanie procedur IVP opracowanych dla psa domowego zwiększałyby szansę na zastosowanie wspomagane go rozrodu innych, rzadkich i zagrożonych gatunków psowatych np. *Alopex lagopus*, *Canis aureus*, *C. latrans*, *C. lupus*. Możliwość zastosowania ulepszonej procedury IVP u zwierząt dziko żyjących pozwoliłaby na ocalenie co najmniej kilkadziesiątu zagrożonych gatunków z rodziny *Canidae*. Obecnie w tzw. Czerwonej Księdze umieszczono ich aż 36, z czego 9 zakwalifikowano jako zagrożone wymarciem.

Oogeneza i ultrastruktura oocytów suk

Renata Włodarczyk, Dorota Bukowska, Jędrzej M. Jaśkowski

z Katedry Weterynarii Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu

Wspomaganie rozrodu tych gatunków oraz utrzymywanie ich populacji *ex situ* (w niewoli) pozwoliłoby na zachowanie materiału genetycznego i przedłużenia gatunków. Obecnie przedmiotem badań w tym obszarze jest optymalizacja warunków dojrzewania oocytów suk w warunkach *in vitro*. Liczne eksperymenty biologii molekularnej mają na celu analizę miejsc syntezy i występowania specyficznych białek oraz ekspresję genów odgrywających ważną rolę w przebiegu procesu dojrzewania jądra komórkowego oraz badanie ultrastruktury oocytów, która ma znaczący wpływ na dojrzewanie cytoplazmatyczne tych gamet.

Oogeneza

U większości gatunków ssaków pierwsze pierwotne komórki płciowe – komórki prapłciowe (KP) można zauważyć u nasady szypuły omocni i u zarodków po zakończonej gastrulacji. W zarodkach myszy wyodrębniono je jeszcze wcześniej, na tylnym końcu smugi pierwotnej w fazie tarczki zarodkowej w 6–7 dniu rozwoju (1). W czasie rozwoju jajnika płodu oogonia mnożą się intensywnie, a ich liczba znacznie wzrasta. W 8-dniowym zarodku myszy znajduje się około 10–100 KP, natomiast w 13 dniu rozwoju 5000–25 000 oogonii. U kobiety w drugim miesiącu ciąży w obu jajnikach płodu znajduje się około 600 000 komórek rozrodczych, a w piątym miesiącu jest ich już 6 000 000 (2). Profaza mejotyczna rozpoczyna się w okresie rozwoju śródmacicznego u gatunków o długiej ciąży. U zwierząt cechujących się krótką ciążą rozpoczyna się ona bezpośrednio po urodzeniu. Najczęściej oogonia stopniowo wchodzi w profazę mejotyczną, począwszy od grup położonych w części rdzeniowej. Rzadziej profaza mejozy rozpoczyna się równocześnie lub prawie równocześnie we

wszystkich oogoniach. Profaza mejotyczna poprzedzona jest fazą S, w której zachodzi podwojenie zawartości DNA i wytworzenie nowych chromatyd. W zygotenie i pachytenie koniugujące chromosomy tworzą charakterystyczne kompleksy synaptemalne. W okresie profazy mejotycznej wzrasta objętość jądra komórkowego. W oocycie pęcherzykowym u świni jest ono pięciokrotnie większe niż w oogonium (3). W leptotenii pory rozmieszczone są równomiernie w całej otoczce, w zygotenie i pachytenie przesuwają się i skupiają się na jednym obszarze otoczki. W diplotenii rozmieszczenie porów ponownie jest równomierne. Przemieszczanie porów związane jest z zanikaniem laminy jądrowej, która znika w leptotenii i pojawia się ponownie w późnym pachytenie (3). Po zakończeniu profazy proces podziału mejotycznego zatrzymuje się w diktiotenii, a oocyty wchodzi w stadium intensywnej aktywności metabolicznej. Sparowane i zespiralizowane chromosomy diktiotenowe ulegają częściowej despiralizacji.

Nie jest jasne, jakie czynniki powodują zatrzymanie procesu mejozy w fazie diktiotenu. Przypuszcza się, że w tym stadium oocyt utrzymuje się dzięki intensywnym procesom metabolicznym oraz aktywności czynnika hamującego dojrzewanie (oocyte maturation inhibitor – OMI) wytwarzanego w pęcherzyku jajnikowym i zawartego w płynie pęcherzykowym. Hamujący wpływ płynu pęcherzykowego na dojrzewanie oocytów wykazano u myszy, szczura, chomika, królika, świni oraz bydła (3). Działanie czynnika nie jest specyficzne gatunkowo, gdyż płyn pęcherzykowy chomika hamuje dojrzewanie oocytów szczura, świni i krowy (3). Oocyt w stadium diktiotenu zostaje otoczony przez komórki sznurów płciowych, które wytwarzają wokół niego pęcherzyk zawiązkowy. Zanikają mostki cytoplazmatyczne, a oocyty

zostają oddzielone od siebie. W tym czasie oocyt wchodzi w fazę intensywnego wzrostu. Początkowo powiększa się średnica oocytu, następnie syntezowane są duże ilości RNA, głównie rybosomalnego rRNA i heterogennego mRNA (4). W oocycie zwiększa się również całkowita ilość białek, które są syntezowane przez sam oocyt oraz pobierane są selektywnie z krwi za pośrednictwem komórek wieńca promienistego. Faza diktiotenu trwa u ssaków bardzo długo, kończy się tzw. dojrzewaniem oocytu, kiedy kontynuowany jest pierwszy podział mejotyczny i wyrzucone ciało kierunkowe.

Ultrastruktura oocytów

Budowa morfologiczna oocytów jest w znacznym stopniu podobna u większości ssaków (5). Zasadnicze różnice dotyczą obecności w oocytach psów dużych ilości lipidów żółtkowych, skupionych wokół pojedynczych centrioli. W oocytach innych gatunków ssaków (kota, konia, bydła, norki, człowieka) występują jedynie niewielkie ilości substancji lipidowych i tłuszczowych (6). W przypadku oocytów suk stwierdzono dużą ilość lipidów żółtkowych związanych są z błonami gładkiej siateczki śródplazmatycznej, biorących udział w syntezie oraz gromadzeniu triglicerydów i lipoprotein (7). W oocytach psa domowego, pośrodku kropli lipidów żółtkowych znajduje się pojedyncza centriola. Podobne obserwacje odnotowano w odniesieniu do niektórych oocytów innych ssaków. Przeważnie jednak obserwowano parę centrioli stanowiących tzw. cytocentrum oocytu (5, 7). Funkcja pojedynczej centrioli w centrum lipidu żółtkowego nie jest do końca poznana. Sugeruje się, że może ona mieć wpływ na lokalizację lub inicjację syntezy lipidów. We wszystkich fazach rozwoju oocyt oraz otaczające go komórki warstwy ziarnistej posiadają charakterystyczne struktury błonowe. Kontakt pomiędzy tymi heterogenicznymi komórkami jest zachowany w oocytach wielu gatunków kręgowców (5, 7, 8, 9, 10). W oocytach psa domowego w zaawansowanej fazie wzrostu, w otoczeniu ciała żółtkowych obserwuje się również pęcherzykowe twory ziarniste, o podwójnej błonie i różnych wielkościach. Mniejsze pęcherzyki mają homogenną macierz z pojedynczymi wakuolami. Zaobserwowano w nich dwa rodzaje kropli lipidowo-żółtkowych: jedne gęste, otoczone błoną, oraz inne, bardziej luźne otoczone szczątkowymi błonami (11).

Z badań Tesoriero (6) wynika, że oocyty pochodzące z pęcherzyków pierwotnych mają centralnie położone jądro z wyraźnym jąderkiem. Ooplazma zawiera wiele dużych okrągłych mitochondriów, gładką siateczkę śródplazmatyczną oraz małe

ciała Golgiego. W tym wczesnym stadium rozwoju oocytu posiadają obszary, w których błona komórkowa ma desmosomalne wzmocnienia, pozbawione mikrofilamentów. Oocyty pochodzące z rosnących pęcherzyków jajnikowych znacznie powiększają swoje rozmiary. Mają także więcej mitochondriów, które często pozostają w kontakcie z błoną jądrową. W ooplazmie występuje jednorodna macierz zawierająca pasma lub błony gładkiej siateczki śródplazmatycznej oraz dużą liczbę ciałek Golgiego. Zarówno w rosnących oocytach, jak i w otaczających je komórkach wzrasta liczba organelli oraz ilość lipidów. Pojawiają się one w oocytach pierwotnych, a ich ilość wzrasta podczas całej oogenezy. Ciała żółtkowe są związane z błonami gładkiej siateczki śródplazmatycznej, która otacza pojedyncze ciała tłuszczowe lub ich grupy. Tłuszcz żółtkowy gromadzi się początkowo wokół pojedynczych centrioli niezwiązanych z aparatem Golgiego lub innymi strukturami cytoplazmatycznymi. Dalsze formowanie ciałek tłuszczu żółtkowego przebiega bez udziału centrioli. W późniejszej fazie rozwoju oocytu mają duże, okrągłe mitochondria oraz wiele ciałek tłuszczu żółtkowego. Obszary cytoplazmy graniczące z komórkami warstwy ziarnistej są bogate w duże aparaty Golgiego, liczne mitochondria oraz specyficzne ziarna korowe (cortical granules) wielkości około 400 nm. Mają one macierz, która jest oddzielona od otaczającej błony niewielką wolną przestrzenią. Pęcherzyki te pozostają w połączeniu z aparatami Golgiego usytuowanymi w korze oocytu. Podobne pęcherzyki, o wielkości 700 nm, otoczone podwójną błoną z heterogenną macierzą znajdują się również w cytoplazmie otaczającej ciała żółtkowe. Niektóre pęcherzyki mają jedno lub więcej niewielkich wakuoli zawierających materiał podobny do tego, który otacza ciała żółtkowe. Oocyty zwiększają swoje rozmiary poprzez wytwarzanie dużych ilości tłuszczowych ciałek żółtkowych. Lipidy te pozostają w osobnych, pęcherzykowatych tworach. Natomiast istniejące ciała tłuszczu żółtkowego powiększają się podczas wzrostu oocytu.

Organelle odgrywające kluczową rolę w dojrzewaniu oocytów

Jądro komórkowe oocytów

W ultrastrukturze jądra komórkowego różni się dwa podstawowe obszary: otoczkę jądrową oraz wnętrze jądra – nukleoplazmę, zawierającą informacje genetyczne (12). Nukleoplazma dzieli się na trzy morfologicznie zdefiniowane regiony: skondensowanej chromatyny, okołochromatynowy oraz przestrzeń międzychromatynową (13).

W dwóch ostatnich obszarach nukleoplazmatycznych pojawiają się struktury zawierające RNP. Nukleoplazma jest również miejscem syntezy heterogennego jądrowego RNA (hnRNA), pre-mRNA oraz małych jądrowych RNA (snRNA; 14). Heterogenne jądrowe RNA stanowi populację cząsteczek o zmiennym wymiarze, z których część reprezentuje serię etapów dojrzewania informacyjnych RNA (mRNA) eksportowanych do cytoplazmy (14). Poza jąderkowymi włóknami i ziarnistościami w jądrze występują również ziarnistości międzychromatynowe (IG), okołochromatynowe (PG) oraz włókna okołochromatynowe (PF) (15). W jądrze komórkowym rozróżnia się następujące regiony strukturalne: otoczkę jądrową (NE), składającą się z zewnętrznej i wewnętrznej błony jądrowej, przestrzeni okołojądrowej, kompleksów porowych oraz peryferyjnej blaszki jądrowej, jąderko (No), heterochromatynę uorganizowaną w gęste struktury zlokalizowane pod otoczką jądrową, włókna jąderka jako chromatynę okołojąderkową oraz kariolimfę (tzw. region międzychromatynowy, IC; 14). Z badań ultrastruktury wynika, że niewielka liczba mitochondriów, ich peryferyjne ułożenie w niewielkich, skoncentrowanych grupach, obecność nielicznych granul korowych związanych z aparatem Golgiego oraz końcami TPZs świadczą o niedojrzałości cytoplazmatycznej oocytów (16). U psa domowego występują dwa typy oocytów, różniące się pod względem położenia jądra komórkowego. Komórki z centralnie położonym jądrem (GVc) wykazują oznaki niedojrzałości, takie jak niewielka liczba organelli heterogenicznie ułożonych w cytoplazmie, natomiast oocyty z peryferyjnie położonym jądrem (GVp) wydają się bardziej zaawansowane w rozwoju (z większą liczbą organelli, rozproszonych na obszarze cytoplazmy. Oocyty GVc mają jąderko pozbawione błony (NSN), natomiast oocyty GVp charakteryzują się obecnością jąderka otoczonego błoną (SN) w konfiguracji obserwowanej również w oocytach myszy oraz człowieka. Oocyty w konfiguracji GVc mają mniejszy potencjał rozwojowy i w niewielkim odsetku dojrzewają w warunkach *in vitro*. Spośród oocytów, które wznowiły podziały mejotyczne, 69% stanowiły komórki GVp (16). Przypuszcza się, że nieprawidłowo dobrane warunki dojrzewania oocytów psa domowego *in vitro* doprowadzają do braku odpowiedniej synchronizacji pomiędzy przebiegiem dojrzewania jądrowego oraz cytoplazmatycznego (16).

Mitochondria

Mitochondria są lipoproteinowymi organellami otoczonymi dwoma błonami

o charakterystycznej strukturze. Ich podstawową funkcją jest transformacja energii zawartej w substratach w wysokoenergetyczne wiązania fosforowe ATP. Są to struktury dynamiczne, przejawiające zdolność przemieszczania się wraz z ruchami cytoplazmy, połączone często z mikrotubulami cytoszkieletu. Podczas podziałów komórkowych mitochondria skupiają się w pobliżu wrzeciona podziałowego (14). W oocytach przemieszczanie się mitochondriów gwarantuje dostarczenie odpowiedniej ilości ATP oraz wapnia w tych regionach komórki, gdzie substancje te są niezbędne do prawidłowego przebiegu dojrzewania (17). Rozmieszczenie mitochondriów w oocyty może być wskaźnikiem zapotrzebowania komórki na energię oraz jony. W oocytach myszy w fazie GVBD (germinal vesicle break down) oraz metafazie I następuje gromadzenie się tych organelli w pobliżu jądra oraz polaryzacja ich ułożenia podczas powstawania wrzeciona podziałowego (18). W zapłodnionych oocytach chomika oraz człowieka gromadzenie się aktywnych mitochondriów następowało w okolicy przedjądrzy (19, 20). Natomiast w oocytach myszy, przed wznowieniem mejozy (GVBD), gromadzenie się mitochondriów następuje w charakterystycznych skupiskach. Agregacja ta ma prawdopodobnie związek z koniecznością zapewnienia w tym czasie wysokiej ilości energii, regulacji stężenia wolnego wapnia niezbędnych do zapoczątkowania GVBD oraz regulacji międzykomórkowej homeostazy (21). Po uruchomieniu mejozy mitochondria pozostają w obszarze okołojądrowym, co wiązane jest z wysokim zapotrzebowaniem energetycznym podczas tworzenia wrzeciona podziałowego, kondensacją chromatyny, ruchem chromosomów oraz wyrzucaniem I ciała kierunkowego (17). W oocytach świń mitochondria pozostają w obszarze okołojądrowym od stadium pęcherzyka zarodkowego (germinal vesicle – GV) do anafazy I, natomiast w dojrzałych oocytach (po ukończeniu podziału mejotycznego w stadium MII) mitochondria są większe i rozłożone w obszarze cytoplazmy. Dużą liczbę aktywnych mitochondriów można zaobserwować w I ciałku kierunkowym (17). Brak natomiast danych odnośnie do dystrybucji mitochondriów podczas dojrzewania oocytów psa domowego.

Cytoszkielet

W ultrastrukturze oocytów, podobnie jak w większości komórek eukariotycznych, cytoplazma podstawowa jest dwufazowa, zawiera tzw. fazę wodną oraz fazę białkową, stanowiącą macierz cytoplazmatyczną. Macierz cytoplazmatyczna (CM – cytoma-trix) jest rozprzestrzenioną w cytoplazmie

dynamiczną i niejednorodną pod względem morfologicznym i molekularnym siecią włókien białkowych. Pośród nich różni się cytoszkielet oraz mikrotrabekularną sieć przestrzenną (microtrabecular lattice – MTL; 14). Cytoszkielet stanowi trójwymiarowy układ trzech rodzajów włókien: mikrofilamentów (MF) o średnicy około 6 nm, mikrotubul (MT) o średnicy około 25 nm oraz filamentów pośrednich (IF – intermediate filaments) o średnicy 10 nm. Filamenty aktynowe i tubulinowe są zbudowane z globularnych podjednostek białkowych, ulegających szybkiej polimeryzacji i depolimeryzacji. Filamenty pośrednie są natomiast mniej podatne na depolimeryzację, a tym samym są bardziej trwałe. Sieć mikrotrabekularna utworzona jest przez cienkie włókna o średnicy 5–10 nm i długości 50–100 nm (22). Łączą one ze sobą filamenty i organelle komórkowe w jedną całość. Mikrotrabekule są białkami towarzyszącymi mikrofilamentom, mikrotubulom i filamentom pośrednim, należą do nich ABP (actin binding proteins), MAP (microtubule associated proteins) oraz IFAP (intermediate filament associated proteins; 14).

Polimeryzacja aktynowy niezorganizowanej w filamente aktynowe odgrywa znaczącą rolę w dojrzewaniu oocytów ssaków oraz w procesie zapłodnienia (23). Niewłaściwe warunki dojrzewania oocytów *in vitro* mają znaczący wpływ na funkcjonowanie mikrotubul i mikrofilamentów, co może być przyczyną nieprawidłowości podczas zapłodnienia oraz wczesnego rozwoju zarodków (24, 25, 26, 27, 28). Z dotychczasowych badań wynika, że dojrzewanie jądra oocytów psa domowego związane jest również z prawidłowym przebiegiem formowania cytoszkieletu (29, 30), zarówno w odniesieniu do mikrotubul (31, 32, 33), jak i mikrofilamentów (32).

Filamenty aktynowe nie biorą aktywnego udziału w uruchomieniu mejozy oraz formowaniu wrzeciona podziałowego, kontrolują natomiast ruch chromatyny podczas dojrzewania oocytów. W stadium GV filamente aktynowe są ułożone w korze oocytów wokoło chromatyny (25, 34). Natomiast po uruchomieniu mejozy (GVBD), około 3 godziny przed wyrzuceniem I ciała kierunkowego, wrzeciono podziałowe formuje się w centrum komórki i rozpoczyna migrację w kierunku błony komórkowej (35). W oocytach myszy, na początku procesu dojrzewania (w stadium GVBD), w centrum komórki rozpoczyna się formowanie wrzeciona podziałowego. Zachowanie kształtu oraz umiejscowienia wrzeciona zapewnia duża ilość obecnej w tym obszarze aktynowy oraz czynniki indukujące polimeryzację mikrofilamentów (jasplakinolide – JA; 36). W niesprzyjających warunkach podczas procesu dojrzewania

dochodzić może do nieprawidłowego formowania cytoszkieletu, uszkodzenia sieci mikrotubul oraz kondensacji chromosomów (37, 38, 39, 35). Z badań przeprowadzonych na oocytach chomika, bydła, świni oraz człowieka wynika, że formowanie wrzeciona podziałowego nie jest regulowane przez mikrofilamenty, natomiast ruch chromosomów ku biegunom komórki jest procesem zależnym od mikrofilamentów (32, 25, 36, 40). Dodatkowo aktywacja promotorów podziałów komórkowych, takich jak MAPK (mitogen-associated protein kinase) oraz MPF (M-phase promoting factor) jest ściśle powiązana z dynamiką mikrotubul (35, 41).

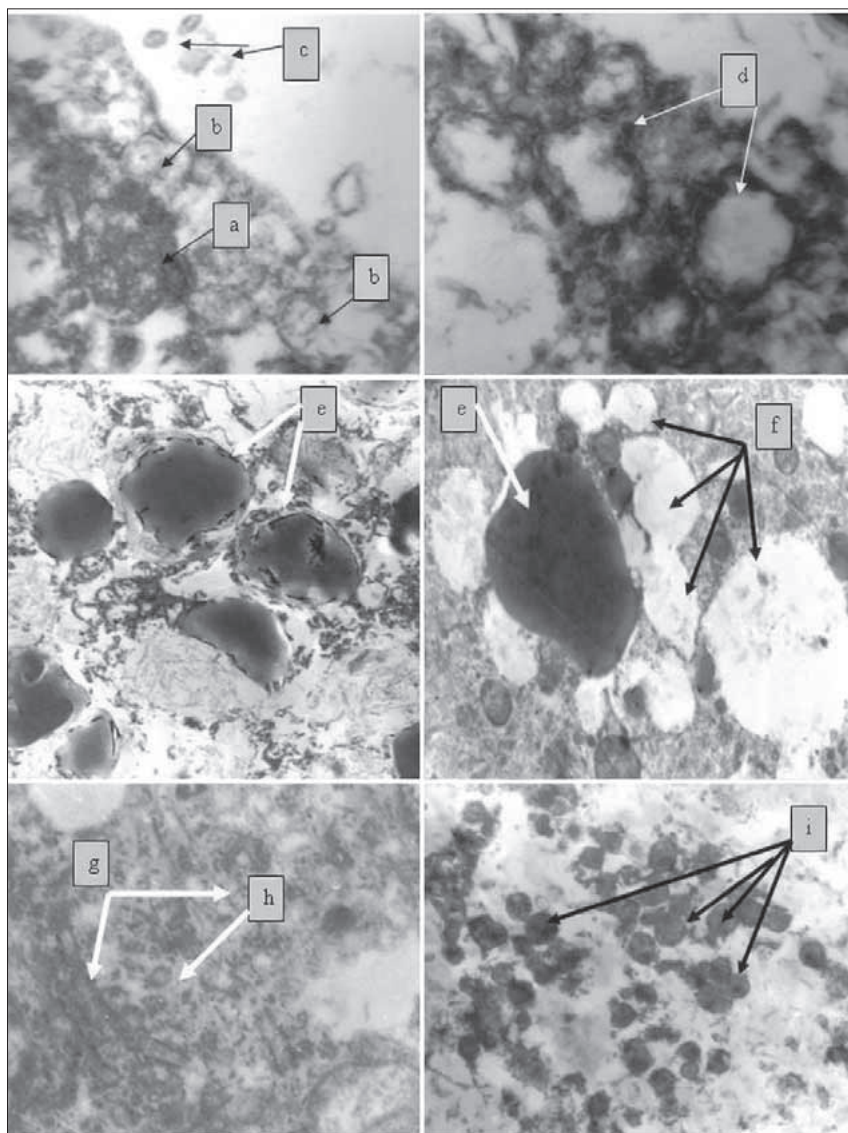
Mikrotubule

Mikrotubule są ultracienkimi tworami tworzącymi układy w kształcie cylindrów. Ich średnica zewnętrzna wynosi od 18 do 34 nm (42). Zbudowane są z protofilamentów – polipeptydowych białek – tubuliny. Budulcem tubuliny jest heterodimer o masie cząsteczkowej 110–120 kDa, utworzony z dwóch liniowo ułożonych monomerów. Protofilament jest polimerem heterodimerów α - i β -tubuliny. Mikrotubule tworzą szkielet wrzeciona podziałowego, zapewniając ruch chromosomów oraz budując zarówno centriole, jak i cztery grupy włókien wrzeciona. Należą do nich włókna: ciągłe, chromosomowe, międzychromosomowe oraz astralne. Podczas podziałów chromosomy poruszają się wzdłuż stacjonarnych mikrotubul kinetochorowych, które skracają się przez depolimeryzację przy kinetochorach w przewężeniach chromosomów (43). Mikrotubule, homologiczne polimery α - i β -tubuliny są dynamicznymi, wewnętrznymi filamentami polarnymi (43). Z badań przeprowadzonych na myszach wynika, że w oocytach można rozróżnić dwie odrębne populacje centrosomów, jedną w obszarze mejotycznego wrzeciona podziałowego, drugą w cytoplazmie (44). Mikrotubule są zbudowane w 85% z tubuliny. Pozostałą część stanowią białka nietubulinowe (białka towarzyszące mikrotubulom – MAP; 21). Tubuliny α i β zawierają odpowiednio 450 i 445 aminokwasów, są niejednorodne i reprezentują rodziny wielogenowe (14). Z analizy położenia mikrotubul w oocytach w różnych fazach cyklu komórkowego wynika, że w stadium GV włókna tubulin podkorowej i okołojądrowej zlokalizowane są w cytoplazmie, natomiast w fazie GVBD niewielkie ilości mikrotubul gromadzą się w okolicy chromatyny. W metafazie I włókna tubulinowe wydłużają się i łączą z chromatyną, otaczając wrzeciono podziałowe. Natomiast w metafazie II mikrotubule obserwuje się w obszarze wrzeciona podziałowego oraz w niewielkich ilościach

w ciałku kierunkowym. W fazie GVBD mikrofilamenty koncentrują się w pobliżu chromatyny, którą obserwowano najczęściej w obszarach bogatych w aktynę. Po wyrzuceniu I ciałka kierunkowego domeny mikrofilamentów występują głównie wokół chromosomów oocyty oraz ciałka kierunkowego (43).

Mikrofilamenty

Aktyna jest białkiem o dobrze poznanej roli, biorącym udział zarówno w przemieszczaniu się komórek, jak i w transporcie błonowym (23). Stanowi ona 15–20% białek każdej komórki eukariotycznej (45). Znane są dwie postacie aktyny: monomeryczna o kształcie sferycznym oraz spolimeryzowana w formie włóknistej (odpowiednio aktyna G oraz aktyna F). Aktyna zbudowana jest z łańcucha polipeptydowego, składającego się z 375 aminokwasów. Struktura pierwszorzędowa tego białka jest wysoce konserwatywna. Wśród zastąpień aminokwasowych większość stanowi podstawienia konserwatywne, występujące najczęściej w obrębie 17 reszt aminoterminalnego obszaru cząsteczki, szczególnie w N-końcowym czteropeptydzie, ale zachowuje ona kwasowy charakter (14). Na podstawie różnic w sekwencji reszt aminokwasowych N-końca zidentyfikowano cztery formy izomerycznych aktyn: α , β , γ , δ . Postać spolimeryzowaną aktyny tworzą dwa spiralnie zwinięte wokół siebie łańcuchy. Typowy jednostartowy filament zawiera 500–1000 protomerów i może być rozpatrywany jako lewoskrętna helisa mająca 2,16 podjednostek na skręt. W badaniach przeprowadzonych na leukocytach wykazano obecność dwóch typów włóknistej aktyny F: stabilnej, zlokalizowanej pod błoną komórkową, oraz labilnej rozproszonej w całej komórce (46). Nowe filamente aktynowe powstają przez fragmentację istniejących już włókien lub *de novo* z wyspecjalizowanych elementów. Najlepiej opisanym komponentem tworzącym włókna aktynowe jest kompleks białek ARP 2/3 (actin-related protein 2/3 complex) katalizujący polimeryzację aktyny, stymulowany poprzez aktywność białek z rodziny WASP/Scar (47). Kolejnymi białkami biorącymi udział w formowaniu włókien aktyny poprzez katalizowanie ich wydłużania oraz ochronie polimerów są forminy (48). Natomiast stabilność filamentów aktynowych zapewnia ADF (actin-depolymerizing factor) ulegający depolimeryzacji w celu ograniczenia powstawania nowych filamentów oraz limitowania elongacji (49). Rola filamentów aktynowych w komórkach eukariotycznych polega przede wszystkim na utrzymywaniu ich odpowiedniego kształtu. Biorą one również udział w przemieszczaniu komórek,

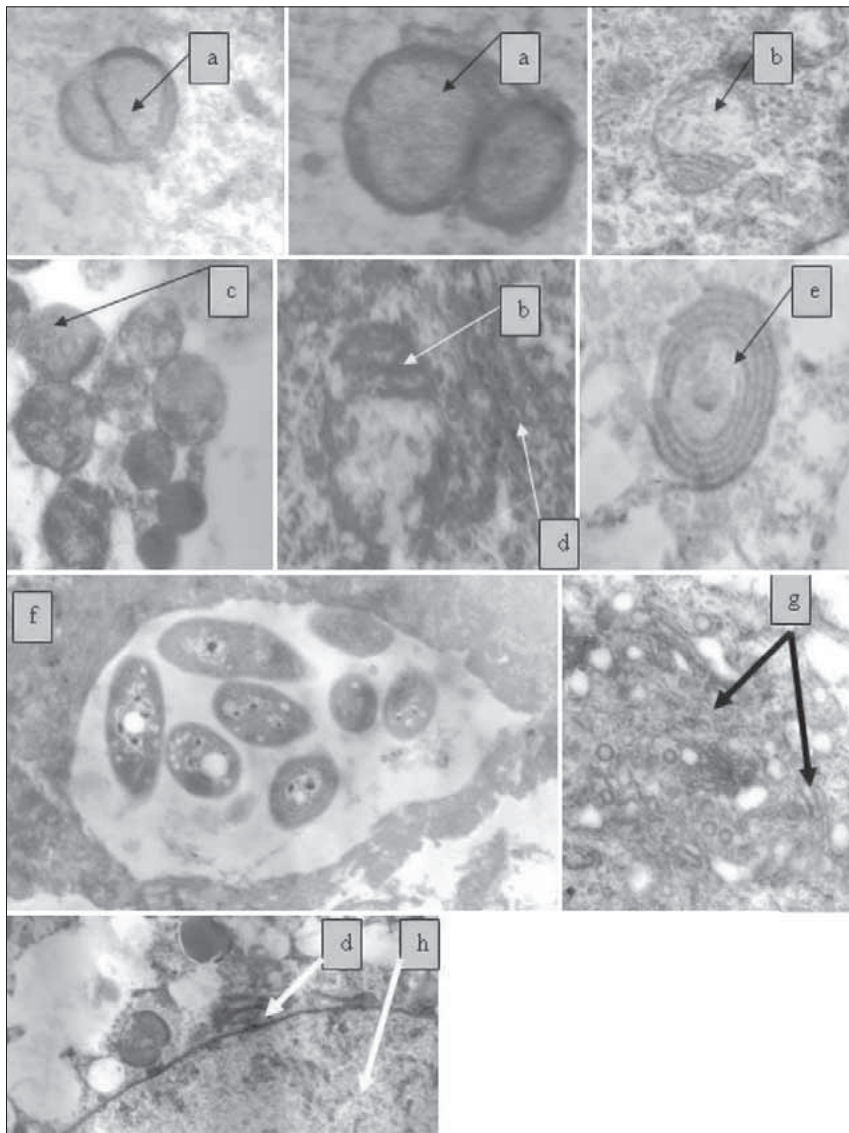


Ryc. 1. Ultrastruktura oocyty suki bezpośrednio po pobraniu z jajników, obraz z mikroskopu elektronowego, powiększenie 10 000 \times ; a – mitochondria o zatartej strukturze grzebieni mitochondrialnych oraz zwiększonej gęstości elektronowej, b – ziarna korowe, c – wypustki cytoplazmatyczne, d – obrzmiałe, przeziernie mitochondria pozbawione grzebieni, e – krople lipidowe, f – wakuolizacja cytoplazmy, g – gładka siateczka śródplazmatyczna, h – aparat Golgiego, i – skupiska mitochondriów pod osłonką przejrzystą

ich wzroście i polaryzacji, ruchu organeli, endo- i egzocytozie, replikacji oraz regulacji genów. Niewiele natomiast wiadomo na temat roli aktyny w gametach. Nieliczne są badania odnośnie do roli cytoszkieletu w rozwoju gamet, zapłodnieniu i wczesnym rozwoju zarodkowym (23). Oprócz mikrotubul głównym składnikiem cytoszkieletu są mikrofilamenty. Zlokalizowane głównie w cytoplazmie otaczają mejotyczne wrzeciono podziałowe oocytów (50, 51, 26, 27, 52, 53, 54). Obszar bogaty w mikrofilamenty służy prawdopodobnie do wzmocnienia i utrzymania uformowanego wrzeciona podziałowego, ustawienia chromosomów w odpowiedniej pozycji podczas podziału komórkowego oraz usuwania ciałka kierunkowego podczas dojrzewania oocyty i zapłodnienia (51, 26, 55).

Szczegółowe badania ultrastruktury oocytów suki przed i w trakcie dojrzewania

Ze wstępnych badań przeprowadzonych w Katedrze Weterynarii Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu wynika, że przed rozpoczęciem procesu dojrzewania oocytów psa domowego mitochondria licznie gromadzą w korowej części cytoplazmy oraz bezpośrednio pod osłonką przejrzystą (ryc. 1). Aparaty Golgiego i błony gładkiej siateczki śródplazmatycznej były nieliczne i występowały jedynie w obszarze okołojądrowym oraz korowym. Ziarna korowe w niewielkiej liczbie obserwowano w okolicy błony komórkowej, rzadziej w głębi cytoplazmy. Obserwacje te są zgodne z wynikami uzyskanymi przez De Lesegno i wsp. (56). Ustalili oni, że ultrastruktura oocytów, które po 72 godzinach dojrzewania



Ryc. 2. Ultrastruktura oocyty suki po dojrzewaniu, obraz z mikroskopu elektronowego, powiększenie 10 000×; a – mitochondria kapturkowe, b – obrzmiałe mitochondrium o częściowo zatartym grzebieniu, c – mitochondria o dużej gęstości elektronowej pozbawione grzebieni, d – gładka siateczka śródplazmatyczna, e – szorstka siateczka śródplazmatyczna, f – mitochondria w pęcherzyku, g – aparat Golgiego, h – jądro komórkowe

na dal pozostawały w stadium GV była podobna do obserwowanej w oocytach przed dojrzewaniem. Pewne różnice polegały na zwiększeniu gładkiej siateczki śródplazmatycznej oraz aparatów Golgiego, które tworzyły skupienia znacznych rozmiarów (56). Telofaza I charakteryzowała się dużym nagromadzeniem mitochondriów pod błoną komórkową, natomiast w metafazie II duża liczba mitochondriów występowała w warstwie korowej. Średniej wielkości skupiska tych organelli obserwowano również w całym obszarze cytoplazmy. Wyniki te są zgodne z obserwacjami własnymi, w których po 72 godzinach dojrzewania stwierdzano silne nagromadzenie mitochondriów w okolicy osłonki przejrzystej. Zaobserwowano również mitochondria kapturkowe, nieopisywane w literaturze w odniesieniu do oocytów psa domowego, notowane jednak w oocytach bydła (57). Oocyty dojrzałe charakteryzowała

obecność licznych skupisk gładkiej siateczki śródplazmatycznej położonych w pobliżu mitochondriów (16, 56). W badaniach własnych podobne rozmieszczenie tych organelli obserwowano już po 24 godzinach inkubacji. Oznakami uszkodzeń mitochondriów były zatarcia struktury grzebieni mitochondrialnych oraz obrzmienie tych organelli (ryc. 2). W 72% niedojrzałych oocytach psa domowego aktywne mitochondria ułożone są peryferyjnie, bezpośrednio pod osłonką przejrzystą. Podobne wyniki uzyskano w badaniach oocytów owcy, bydła oraz świni (58, 17). W oocytach suki taki sposób umiejscowienia skupisk mitochondriów po upływie 72 godzin inkubacji, może być związany z utrzymywaniem ścisłych połączeń szczelinowych w obszarze COC po ukończeniu dojrzewania oocytów. Gromadzenie mitochondriów w obszarze okołojądrowym rozpoczyna się w momencie zapoczątkowania stadium

GVBD i jest prawdopodobnie związane z wysokim zapotrzebowaniem energetycznym wywołanym wznowieniem podziału mejotycznego w oocytach. Przypuszcza się, że mitochondria leżące w obszarze okołojądrowym zapewniają odpowiednią ilość ATP, niezbędnego do zapoczątkowania fazy GVBD (17). Mitochondria prawdopodobnie są również regulatorem stężenia wolnego wapnia. Udowodniono, że dostarczenie dużej ilości wolnego wapnia jest czynnikiem niezbędnym do podjęcia fazy GVBD przez oocyty świni, a ułożenie mitochondriów jest ściśle związane z regulacją wewnątrzkomórkowej homeostazy oocytów (59, 60). Liczne gromadzenie się mitochondriów w okolicy jądra obserwowano we wszystkich stadiach podziału mejotycznego. Było to spowodowane prawdopodobnie przez wysokie zapotrzebowanie energetyczne podczas formowania wrzeciona podziałowego, kondensację chromatydy, przemieszczania chromosomów oraz wyrzucenia ciała kierunkowego.

Piśmiennictwo

1. Snow M.H.L.: Autonomous development of the parts isolated from primitive streak stage mouse embryo. Is development clonal? *J. Embriol. Exp. Morphol.* 1981, **65**, 289-297.
2. Baker T.G.: A quantitative and cytological study of germ cells in human ovaries. *Proc. Roy. Society.* 1963, **158**, 417-433.
3. Biliński S., Bielańska- Osuchowska Z., Kawiak J., Przelęcka A.: *Ultrastruktura i funkcja komórki.* Tom 6. *Oogeneza.* PWN, Warszawa 1994.
4. Stępińska U.: Mateczny RNA- jego synteza i znaczenie we wczesnych stadiach rozwoju zarodkowego zwierząt. *Post. Biol. Kom.* 1991, **18**, 117-137.
5. Anderson E., Alhertini D.: Gapjunctions between the oocyte and companion follicle cells in the mammalian ovary. *J. Cell Biol.* 1976, **71**, 680-686.
6. Tesoriero J.V.: Early ultrastructural changes of developing oocytes in the dog. *J. Morphol.* 1981, **168**, 171-179.
7. Anderson E.: The localization of acid phosphates and uptake of horseradish peroxidase in the oocyte and follicle cells of mammals. W: *Oogenesis.* J.D. Biggers and A.W. Schuetz, (edit), University Park Press, Baltimore 1970, s. 87-117.
8. Gilula N.B., Epstein M.L., Beers W.H.: Cell-to-cell communication and ovulation. A study of the cumulus-oocyte complex. *J. Cell Biol.* 1978, **78**, 58-75.
9. Hope J.: The fine structure of the developing follicle of the rhesus ovary. *J. Ultrastruct. Res.* 1965, **12**, 592-610.
10. Norrevang A.: Electron microscopic morphology of oogenesis. *Int. Rev. Cytol.* 1968, **23**, 113-185.
11. Szabo P.L.: Ultrastructure of the developing dog oocyte. *Anat. Rec.* 1967, **157**, 330.
12. Raska I., Ochs R.L., Salamin- Mitchell L.: Immunocytochemistry of the cell nucleus. *Elektron Microsc. Rev.* 1990, **3**, 301-353.
13. Fakan S.: Structural support for RNA synthesis in the cell nucleus. *Meth. Achiev. Exp. Pathol.* 1986, **12**, 105-140.
14. Klyszejko-Stefanowicz L.: *Cytobiochemia. Biochemia niektórych struktur komórkowych.* Wydawnictwo Naukowe PWN 2002.
15. Suciu D.: Nuclear volume and chromatin organization in some radiosensitive and radioresistant mammalian cells. *J. Theor. Biol.* 1986, **117**, 587-596.
16. De Lesegno C.V., Reynaud K., Pechoux C., Thoumire S., Chastant-Maillard S.: Ultrastructure of canine oocytes during in vivo maturation. *Mol. Reprod. Dev.* 2008, **75**, 115-125.
17. Sun Q.Y., Wu G.M., Lai L., Park K.W., Cabot R., Cheong H.T., Day B.N., Prather R.S., Schatten H.: Translocation of active mitochondria during pig oocyte maturation, fertilization and early embryo development in vitro. *Reproduction* 2001, **122**, 155-163.
18. Calarco P.G.: Polarization of mitochondria in the unfertilised mouse oocytes. *Development and Genetics* 1995, **16**, 36-46.

19. Bavister B.D., Squirrell J.M.: Mitochondrial distribution and function in oocytes and embryos. *Human Reprod. Suppl.* 2000, **2**, 189-198.
20. Van Blerkom J., Davis P., Alexander S.: Differential mitochondrial distribution in human pronuclear embryos leads to disproportionate inheritance between blastomeres: relationship to microtubular organization, ATP content and competence. *Human Reprod.* 2000, **15**, 2621-2633.
21. Lockwood A.H. The biological regulation of microtubule assembly and function. *Symp. Mol. Cell. Biol.* 1987, **12**, 271-288.
22. Clegg J.S. Intracellular water and cytomatrix: some methods of study and current views. *J. Cell Biol.* 1984, **99**, 167-171.
23. Sun Q. Y., Schatten H.: Regulation of dynamic events by microfilaments during oocyte maturation and fertilization. *Reproduction* 2006, **131**, 193-205.
24. Hyttel P., Xu K., Smith S., Greve T.: Ultrastructure of in vitro oocyte maturation in cattle. *J. Reprod. Fert.* 1986, **78**, 615-625.
25. Kim N.-H., Chung H. M., Cha K.Y., Chung K. S.: Microtubule and microfilament organization in maturing human oocytes. *Hum. Reprod.* 1998, **13**, 2217-2222.
26. Kim N.-H., Funahashi H., Prather R. S., Schatten G., Day B. N.: Microtubule and microfilament dynamics in porcine oocytes during meiotic maturation. *Mol. Reprod. Dev.* 1996, **43**, 248-255.
27. Kim N.-H., Moon S. J., Prather R. S., Day, B. N.: Cytoskeletal alteration in aged oocytes and parthenogenesis. *Mol. Reprod. Dev.* 1996, **43**, 513-518.
28. Kim N.H., Chung K. S., Day B. N.: The role and distribution of microtubule and microfilaments during fertilization and parthenogenesis. *J. Reprod. Fertil.* 1997, **111**, 143-149.
29. Gallicano G.I.: Composition, regulation and function of the cytoskeleton in mammalian eggs and embryos. *Frontiers in Bioscience* 2001, **6**, 1089-1108.
30. Shin M.R., Kim N.H.: Maternal gamma (g)-tubulin is involved in microtubule reorganization during bovine fertilization and parthenogenesis. *Mol. Reprod. Dev.* 2003, **64**, 438-445.
31. Ruder A.D., Murry A.W.: The spindle assembly checkpoint. *Current Opinion in Cell Biology* 1996, **8**, 773-780.
32. Kim N.H., Cho S.K., Choi S.H., Kim E.Y., Park S.P., Lim J.H.: The distribution and requirements of microtubules and microfilaments in bovine oocytes during in vitro maturation. *Zygote* 2000, **8**, 25-32.
33. Brunet S., Pahlavan G., Taylor S., Maro B.: Functionality of the spindle checkpoint during the first meiotic division of mammalian oocytes. *Reproduction* 2003, **126**, 443-450.
34. Wang W.H., Abeydeera L.R., Prather R.S., Day B.N.: Polymerization of nonfilamentous actin into microfilaments is an important process for porcine oocyte maturation and early embryo development. *Biol. Reprod.* 2000, **62**, 1177-1183.
35. Verlhac M.H., Lefebvre C., Guillaud P., Rassinier P., Maro B.: Asymmetric division in mouse oocytes: with or without Mos. *Current Biology* 2000, **10**, 1303-1306.
36. Terada Y., Simerly C., Schatten G.: Microfilament stabilization by jasplakinolide arrests oocyte maturation, cortical granule exocytosis, sperm incorporation cone resorption, and cell-cycle progression, but not DNA replication, during fertilization in mice. *Mol. Reprod. Dev.* 2000, **56**, 89-98.
37. Longo F.J., Chen D.Y.: Development of cortical polarity in mouse eggs: involvement of the meiotic apparatus. *Dev. Biol.* 1985, **107**, 382-394.
38. Roth Z., Hansen P.J.: Disruption of nuclear maturation and rearrangement of cytoskeletal elements in bovine oocytes exposed to heat shock during maturation. *Reproduction* 2005, **129**, 235-244.
39. Shen Y., Betzendahl I., Sun F., Tinneberg H.R., Eichenlaub-Ritter U.: Non-invasive method to assess genotoxicity of nocodazole interfering with spindle formation in mammalian oocytes. *Reprod. Toxicol.* 2005, **19**, 459-471.
40. Sun Q.Y., Lai L., Park K.W., Kuhholzer B., Prather R.S., Schatten H.: Dynamic events are differently mediated by microfilaments, microtubules, and mitogen-activated protein kinase during porcine oocyte maturation and fertilization in vitro. *Biol. Reprod.* 2001, **64**, 879-889.
41. Verlhac M.H., de Pennart H., Maro B., Cobb M.H., Clarke H.J.: MAP kinase becomes stably activated at metaphase and is associated with microtubule-organizing centers during meiotic maturation of mouse oocytes. *Dev. Biol.* 1993, **158**, 330-340.
42. Slautterback D.B.: Cytoplasmic microtubules. *J. Cell Biol.* 1963, **18**, 367-388.
43. Mitchison T., Evans L., Schultze E., Kirchner M. Sites of microtubule assembly and disassembly in the mitotic spindle. *Cell* 1986, **45**, 515-527.
44. Messinger S. M., Albertini D. F. Centrosome and microtubule dynamics during meiotic prophase. *Mol. Reprod. Dev.* 1991, **25**, 374-383.
45. Korn E.D.: Actin polymerization and its regulation by proteins from nonmuscle cells. *Physiol. Rev.* 1982, **62**, 672-737.
46. Watts R.G., Howard T.H.: Evidence for a gelsolin-rich labile F-actin pool in human polymorphonuclear leukocytes. *Cell Motil. Cytoskel.* 1992, **21**, 25-37.
47. Gunst S.J.: Actions by actin: reciprocal regulation of contractin activity by tyrosine kinases and F-actin. *Bioch. J.* 2004, **380**, e7-e8.
48. Harris E.S., Higgs H.N.: Actin cytoskeleton: formins lead the way. *Current Biology* 2004, **14**, R520-R522.
49. Gohla A., Birkenfeld J., Bokoch G.M.: Chronophin, a novel HAD-type serine protein phosphatase, regulates formin-dependent actin dynamics. *Nature Cell Biology.* 2005, **7**, 21-29.
50. Manabe N., Imai Y., Ohno H., Takahagi Y., Sugimoto M., Miyamoto H.: Apoptosis occurs in granulosa cells but not cumulus cells in the atretic antral follicles in pig ovaries. *Experientia.* 1996, **52**, 647-51.
51. Webb M., Howletts K., Maro B.: Parthenogenesis and cytoskeleton organization in aging mouse eggs. *J. Embryol. Exp. Morphol.* 1986, **95**, 131-145.
52. Albertini D. F., Combelles C. M. H., Benecchi E., Carabatsos M. J.: Cellular basis for paracrine regulation of ovarian follicle development. *Reproduction.* 2001, **121**, 647-653.
53. Albertini D. F.: Cytoplasmic reorganization during the resumption of meiosis in cultured preovulatory rat oocytes. *Dev. Biol.* 1987, **120**, 121-131.
54. Zernicka-Goetz M., Kubiak J. Z., Antony C., Maro B.: Cytoskeletal organization of rat oocytes during metaphase II arrest and following abortive activation: a study by confocal laser scanning microscopy. *Mol. Reprod. Dev.* 1993 **35**, 165-175.
55. Kim N.-H., Simerly C., Funahashi H., Schatten G., Day B. N.: Microtubule organization in porcine oocytes during fertilization and parthenogenesis. *Biol. Reprod.* 1996, **54**, 1397-1404.
56. De Lesegno C.V., Reynaud K., Pechoux C., Chebrou M., Chastant-Maillard S.: Ultrastructural evaluation of in vitro matured canine oocytes. *Reprod. Fertil. Dev.* 2008, **20**, 626-639.
57. Lodde V., Modina S., Maddox-Hyttel P., Franciosi F., Lauria A., Luciano A.M.: Oocyte morphology and transcriptional silencing in relation to chromatin remodeling during the final phases of bovine oocyte growth. *Mol. Reprod. Dev.* 2008, **75**, 915-924.
58. Cran D.G., Moor R.M., Hay M.F.: Fine structure of the sheep oocyte during antral follicle development. *J. Reprod. Fertil.* 1980, **59**, 125-132.
59. Kaufman M.L., Homa S.T.: Defining a role for calcium in the resumption and progression in the pig oocytes. *J. Exp. Zool.* 1993, **265**, 69-76.
60. Lane M., Bavister B.D.: Calcium homeostasis in early hamster preimplantation embryos. *Biol. Reprod.* 1998, **59**, 1000-1007.