

# **Wybrane markery jakości oocytów ssaków warunkujące ich zdolność do dojrzewania in vitro i rozwoju zarodkowego**

*Jolanta Opiela, Lucyna Kątska-Książkiewicz  
Dział Biotechnologii Rozrodu, Immuno- i Cytogenetyki Zwierząt,  
Instytut Zootechniki, ul. Krakowska 1, 32-083 Balice  
e-mail: jopiela@izoo.krakow.pl*

**Słowa kluczowe:** bydło, oocyt, zarodek, IVP, BCB, Bcl-2, Bax, kaspazy

## **Wstęp**

Jednym z czynników ograniczających postęp hodowlany u bydła jest stosunkowo mała wydajność rozrodcza samic. Tymczasem jajnik bydłocy ma ogromny potencjał rozrodczy w postaci niedojrzałych oocytów zawartych w pęcherzykach, które znajdują się w różnych stadiach wzrostu i rozwoju. Dynamiczny rozwój biotechnologii rozrodu, który nastąpił w ostatnich 20. latach ubiegłego stulecia, zaowocował m.in. opracowaniem metod pozwalających na lepsze wykorzystanie potencjału rozrodczego samicy. Wynika ono ze stosowania w rozrodzie zwierząt takich metod biotechnologicznych, jak przenoszenie zarodków, seksowanie nasienia lub zarodków celem uzyskiwania zwierząt o pożądanej płci, klonowanie zarodkowe i somatyczne czy modyfikacja genomu celem otrzymania zwierząt transgenicznych. W związku z tym powstało znaczne zapotrzebowanie na gamety żeńskie oraz zarodki, zarówno dla celów hodowlanych, jak i doświadczalnych.

U bydła zarodki przenoszone zsynchronizowanym biorczyniom uzyskiwane są metodami in vivo (np. w realizacji programu hodowlanego MOET – ang. Multiple Ovulation and Embryo Transfer) lub metodami in vitro. Obecnie, przy użyciu metod in vitro, możliwe jest uzyskanie u bydła około 90% oocytów osiągających dojrzałość jądra (stadium metafazy II podziału mejotycznego), z których ponad 80% ulega zapłodnieniu in vitro, a ponad 70% podejmuje podziały zarodkowe. Jednakże odsetek zapłodnionych oocytów osiągających w kompleksowym systemie in vitro stadium blastocysty, a także odsetek zarodków, które po przeniesieniu do dróg rodnych biorczyni wykazują zdolność do pełnego rozwoju ulega zdecydowanej redukcji i nawet

w optymalnych warunkach nie przekracza na ogół 40% wyjściowej liczby hodowanych zygot [7, 27]. Choć wydajność ta jest już akceptowana przez praktykę (na co wskazują raporty komercyjnych firm biotechnologicznych, a także Międzynarodowych Towarzystw Przenoszenia Zarodków tj. IETS i AETE), to jednak doskonalenie stosowanych metod leży wciąż w sferze zainteresowań zespołów badawczych zajmujących się problematyką embriologii eksperymentalnej i stosowanej.

## **Selekcja niedojrzałych oocytów – ocena morfologiczna i biochemiczna**

---

Niedojrzałe oocyty, które przeznaczane są do hodowli *in vitro*, stanowią populację heterogeniczną, o zróżnicowanych kompetencjach rozwojowych. Podczas ich przygotowywania do hodowli *in vitro* istotnym elementem metody jest selekcja, która przeprowadzana jest bezpośrednio po uzysku. Dotychczas stosowane metody selekcji niedojrzałych oocytów bydłych bazują na obserwacjach wyglądu morfologicznego komórek wzgórka jajonośnego otaczających oocyt oraz cytoplazmy oocytu. Morfologicznie prawidłowy oocyt powinien być otoczony ścisłą i spoistą warstwą komórek wzgórka jajonośnego i posiadać cytoplazmę jednolicie granulowaną, bez zmian morfologicznych w formie przejaśnień, nieregularności czy fragmentacji. Ustalono ścisły związek między morfologią niedojrzałego oocytu a efektywnością metody pozaustrojowego uzyskiwania zarodków [7, 30]. Wykazano również, że oocyty o obniżonej jakości morfologicznej posiadają drastycznie obniżone kompetencje rozwojowe. Jednakże, mimo stosowania wspomnianych kryteriów selekcji morfologicznej, jakość dojrzałych *in vitro* oocytów, a także zarodków rozwijających się z tych oocytów po zapłodnieniu *in vitro*, jest zróżnicowana i zdecydowanie obniżona w porównaniu z oocytami i zarodkami powstającymi w warunkach *in vivo* [50]. Wspomniane różnice dotyczą morfologii, tempa rozwoju, metabolizmu zarodka (np. zawartości wewnątrzkomórkowego glutationu – GSH), ultrastruktury (lokalizacji mitochondriów, rozmieszczenia cytoszkieletu), ekspresji genów, a także podatności na krio-konserwację [24]. Różnice te mają decydujący wpływ na kompetencje rozwojowe dojrzałych *in vitro* oocytów. Można zakładać, że niższa jakość dojrzewających *in vitro* oocytów jest efektem nie tylko niedoskonałych warunków, w których jest prowadzona hodowla, lecz wynika również z niewłaściwie przeprowadzanej selekcji materiału przeznaczonego do dojrzewania *in vitro*.

Ta sytuacja uzasadnia konieczność udoskonalenia metod selekcji gamet żeńskich. Ostatnio opracowano nową, przyżyciową metodę selekcji niedojrzałych oocytów świni [41], kozy [42] i bydła [2], które przeznaczane są do dojrzewania *in vitro*. Selekcji dokonuje się po przyżyciowym barwieniu kompleksów oocyt-komórki wzgórka jajonośnego brylantowym błękitem krezyłu (brilliant cresyl blue, BCB). Barwienie to

pozwała na określenie aktywności dehydrogenazy glukozy-6-fosforanowej (G6PD), enzymu syntetyzowanego w pierwszej połowie fazy S, w czasie wzrostu oocyta [49]. Aktywność enzymu G6PD może służyć jako marker kompetencji rozwojowych oocyta. Enzym ten odgrywa istotną rolę w czasie wzrostu komórki dostarczając NADPH dla regulacji procesów oksydacyjnych. W obecności aktywnego enzymu G6PD następuje redukcja koloru błękitnego w barwniku BCB do związku bezbarwnego. Zwiększona aktywność enzymatyczna G6PD jest negatywnie skorelowana z kompetencją mejotyczną oocytów, a tym samym efektywnością zapłodnienia i rozwoju zarodkowego [2, 42].

Mimo, że oocyty bydłce poddane selekcji w oparciu o aktywność G6PD i ocenione jako BCB+ wykazują istotnie wyższe kompetencje rozwojowe w porównaniu z oocytami BCB-, to jednak efektywność ich zapłodnienia i rozwoju zarodkowego pozostaje wciąż niższa w porównaniu do oocytów dojrzewających, zapładnianych i rozwijających się *in vivo*. Zatem oznacza to, że obniżone kompetencje rozwojowe oocytów mają podłoże znacznie głębsze, czyli selekcja morfologiczna i biochemiczna nie pozwala na pełną ocenę ich jakości. Przyczyną obniżonej kompetencji oocytów mogą być zaburzenia w aktywacji genów prowadzące do zmian apoptotycznych w komórce, niezauważalnych w ocenie morfologicznej. Te zmiany apoptotyczne w oocycie mogą powstawać już podczas jego wzrostu w pęcherzyku lub też w okresie późniejszym, w czasie dojrzewania *in vitro*.

## Molekularne mechanizmy apoptozy

Apoptoza, opisywana również jako śmierć programowana, jest aktywnym procesem współodpowiedzialnym za kontrolę liczby i rodzaju komórek [23]. Jądro komórki, w której rozpoczyna się apoptoza ulega obkurczeniu, następuje zagęszczenie chromatyny i jej przemieszczanie na obwód. Dochodzi do postępującej degradacji DNA, której charakterystycznym obrazem, wykrywanym poprzez elektroforezę w żelu agarozowym, jest tzw. drabinka [36]. Komórki apoptotyczne tracą znaczne ilości wody, co prowadzi do kondensacji chromatyny, obkurczenia cytoplazmy oraz wzrostu jej gęstości. Następują również zmiany w błonie komórkowej polegające na jej obkurczeniu i pofałdowaniu, któremu towarzyszy tworzenie drobnych uwypukleń (ang. blebbing) na powierzchni. Inną charakterystyczną cechą komórek apoptotycznych jest pojawienie się tzw. ciałek apoptotycznych, tj. obłonionych fragmentów komórki, które zawierają organelle komórkowe, resztki chromatyny i cytoplazmy [29].

W przebiegu procesu apoptozy dochodzi do kaskady zdarzeń, które przebiegają trójfazowo; fazę pierwszą określa się jako inicjację czy wzbudzenie, następna to faza wykonawcza, a ostatnia faza zniszczenia. Wśród czynników inicjujących apoptozę najczęściej wymienia się reakcje rozpoznawania i wiązania ligandów z odpowiednimi receptorami śmierci na powierzchni komórek, ich aktywację, a także aktywację ka-

spaz inicjujących. Kaspazy (ang. caspases-cysteine-dependent aspartate specific proteases) są odpowiedzialne za proteolityczny rozpad niektórych składników cytoszkieletu [44]. W czasie aktywacji kaspaz komórka ulegająca procesowi apoptozy sygnalizuje o tym sąsiednim komórkom poprzez fosfatydyloserynę (PS), która zostaje przemieszczona z wewnętrznej na zewnętrzną warstwę błony plazmatycznej i w ten sposób eksponowana na środowisko zewnątrzkomórkowe [48]. Badania Deneckera i in. [10] wykazały, że przemieszczenie PS stanowi jedno z wcześniejszych zdarzeń w szlaku apoptotycznym, po którym następuje spadek potencjału błonowego mitochondriów oraz uwalnianie cytochromu c z ich przestrzeni międzybłonowych. Przemieszczanie PS na powierzchnię komórki można monitorować poprzez wiązanie tego fosfolipidu za pomocą aneksyny V połączonej z fluoresceiną.

Przemieszczenie PS oraz aktywacja kaspaz jest sygnałem do rozpoczęcia fazy wykonawczej apoptozy [3]. Faza ta jest kontrolowana przez produkty genów, które mogą aktywować bądź zatrzymywać czy też opóźniać apoptozę poprzez blokowanie aktywności kaspaz wykonawczych. Natomiast aktywacja kaspaz wykonawczych przez kaspazy inicjujące lub inne białka (GrB, ang. granzyme B) prowadzi do nieodwracalnego etapu apoptozy, który jest regulowany przez białka rodziny Bcl-2 oraz IAP (ang. inhibitor of apoptosis proteins) [39]. Czas aktywacji kaspaz wykonawczych mieści się w zakresie od kilku minut do kilku godzin i zależy od typu oraz stanu funkcjonalnego komórek. Aktywowane kaspazy wykonawcze, bezpośrednio albo w kaskadzie kaspaz, dokonują proteolizy białek niezbędnych dla życia komórek jak białka cytoszkieletu, otoczki jądrowej, białka odpowiedzialne za organizację przestrzenną DNA oraz jego naprawę [25]. W fazie wykonawczej dochodzi do otwarcia megakanatów mitochondrialnych, obniżenia potencjału błonowego mitochondriów oraz zakłócenia homeostazy jonów  $\text{Ca}^{2+}$  [11]. Obniżenie wartości potencjału błonowego mitochondriów prowadzi do uwolnienia z ich przestrzeni międzybłonowej białek proapoptotycznych, cytochromu c, białek AIF (ang. apoptosis inducing factor), białka Smac/DIABLO (ang. second mitochondrial activator of caspase/direct IAP binding protein with low pI tj. wtórny mitochondrialny aktywator kaspazy/białko bezpośrednio wiążące IAP o niskim pI), a także kaspaz [11, 12, 47].

## **Markery apoptozy – białka rodziny Bcl-2 i kaspazy**

---

Niezwykle istotną rolę w regulacji apoptozy odgrywają białka rodziny Bcl-2 (ang. B-cell leukemia/lymphoma-2), które mogą aktywować lub hamować przebieg procesu [35]. Aktywność białek Bcl-2 warunkuje przepuszczalność błon mitochondrialnych oraz wpływ czynników proapoptotycznych. Ponadto, białka te aktywują bądź hamują aktywność kaspaz odpowiedzialnych za proteolityczny rozpad komórek [1, 17, 44].

Dotychczas poznano kilkanaście białek rodziny Bcl-2, a liczba nowo wykrywanych nieustannie wzrasta [1, 5]. Białka tej rodziny podzielono na trzy klasy: klasa I czyli podrodzina Bcl-2 to białka anty-apoptotyczne do których zalicza się Bcl-2, Bcl-X<sub>L</sub>, Bcl-w, A1/Bfl-1, Mcl-1, klasa II to podrodzina Bax, składająca się z białek o działaniu pro-apoptotycznym, takich jak Bax, Bak, Bok i Bcl-X<sub>S</sub> oraz klasa III to podrodzina BH3, w skład której wchodzi białka proapoptotyczne Bad, Bid, Bik, Bim, Blk i Hrk [29, 46]. Cechą charakterystyczną białek rodziny Bcl-2 jest występowanie wśród nich tzw. domen homologii – BH (ang. Bcl-2 homology), opisywanych jako BH1, BH2, BH3 i BH4 [29]. Domeny te decydują o zdolności do dimeryzacji białek tej rodziny, ułatwiając tworzenie homo- i heterodimerów, a także oddziaływanie z innymi białkami regulującymi apoptozę. Różnice w występowaniu domen homologii stały się podstawą podziału białek rodziny Bcl-2 na trzy klasy. Przypuszczalne mechanizmy działania białek rodziny Bcl-2 zaproponował Hengartner [23]. Białka te mogą oddziaływać poprzez:

- a) formowanie porów, przez które cytochrom c i inne białka promujące apoptozę mogą wypływać z przedziału międzybłonowego mitochondriów,
- b) heterodimeryzację między białkami pro- i anty-apoptotycznymi tej rodziny,
- c) bezpośrednią regulację aktywności kaspaz, za pośrednictwem białek adaptorowych,
- d) interakcje z innymi białkami mitochondrialnymi, albo w celu utworzenia megakanalu, przez który mogą się przemieszczać białka apoptogenne lub modulowania homeostazy mitochondriów,
- e) oligomeryzację białek w celu tworzenia kanałów jonowych o niewielkiej selektywności [cyt za 29].

Dotychczasowe wyniki badań dowodzą, że białka Bcl-2 są przede wszystkim modyfikatorami funkcji mitochondriów, czynników przeciwdziałających stresowi oksydacyjnemu [11] oraz regulatorami wewnątrzkomórkowego stężenia jonów Ca<sup>2+</sup> [16].

Białko Bcl-2, inhibitujące apoptozę, kontroluje uwalnianie jonów Ca<sup>2+</sup> z komórkowych zapasów siateczki śródplazmatycznej i mitochondriów [1, 17]. Białko to bezpośrednio blokuje uwalnianie cytochromu c z mitochondriów [8]. Natomiast białko Bax, promujące apoptozę, powoduje gwałtowną destabilizację mitochondriów oraz uwolnienie cytochromu c, który następnie aktywuje kaskadę kaspaz [19, 44]. Udowodniono, że białko Bax może ulegać heterodimeryzacji z białkiem Bcl-2 pokonując anty-apoptotyczny efekt Bcl-2 [45].

Ekspresję genu Bax stwierdzono również w oocytach [14, 26]. Badania prowadzone zarówno na komórkach somatycznych jak i na jajnikach płodowych myszy wykazały, że apoptozie towarzyszy zwiększona ekspresja białka Bax. Jednocześnie nie obserwowano zmian w poziomie anty-apoptotycznego białka Bcl-2 [9]. Rola białka Bax we wzbudzaniu apoptozy w komórkach płciowych płodu myszy potwierdziło również doświadczenie Rucker i in. [43]. Badacze ci wykazali, że inaktywacja Bax, przy jednoczesnym braku Bcl-x, zapobiega masowej apoptozie oocytów. Natomiast

wstrzyknięcie białka Bax do izolowanych oocytów wywołuje apoptozę [32]. Stwierdzono ponadto, że eliminacja z jajnika oocytów, w których powstały anomalie na skutek błędów w mejozie następuje bez udziału białka Bax [33]. Doświadczenie to sugeruje, że w żeńskich komórkach płciowych istnieją również inne szlaki sygnalizacji pro-apoptotycznej, niezależne od Bax [33].

Badania nad ekspresją genów Bax i Bcl-2 znalazły aspekt aplikacyjny w medycynie ludzkiej. U kobiet leczonych przeciwnowotworowo dochodzi do niepłodności spowodowanej utratą komórek płciowych na drodze apoptozy zależnej od białka Bax. Używając myszy jako zwierzęcia modelowego wykazano, że chemioterapeutyk, doxorubicin (Adriamycyna, 14-hydroxydaunomycyna) nie wywołuje apoptozy w oocytach z wyłączonym genem Bax, zarówno *in vitro* jak i *in vivo* [37]. Najnowsze metody leczenia, zmierzające do zminimalizowania szkodliwego wpływu na jajnik chemio- i radioterapii, prowadzone są dwutorowo tj., albo poprzez inaktywację genu Bax lub poprzez zwiększenie ekspresji białka Bcl-2 w oocytach [34]. Wyniki uzyskane na myszach wskazują, że powyższe sposoby postępowania mogą być skuteczne [34].

Również w oocytach i zarodkach była wykazano występowanie korelacji między ekspresją białek Bcl-2 i Bax a stopniem kompetencji rozwojowej [50]. W prawidłowych oocytach i zarodkach obserwuje się przewagę białek Bcl-2 nad Bax, natomiast sytuacja odwrotna cechuje oocyty i zarodki o oznakach apoptozy. Podobne rezultaty obserwowano u myszy [14]. Można zakładać, że ekspresja białek Bcl-2 i Bax może służyć jako marker jakości oocytów i blastocyst.

Szybkość przejścia komórek do fazy zniszczenia zależy od typu komórek oraz rodzaju i siły bodźca apoptotycznego. Za realizację nieodwracalnej fazy wykonawczej apoptozy odpowiedzialne są kaspazy. Dotychczas zidentyfikowano u ssaków 14 enzymów tej rodziny [6]. Charakterystyczną cechą kaspaz jest wykorzystanie aktywnego centrum cysteiny w katalizie ataku proteolitycznego na określone substraty oraz ich cięcie zawsze po reszcie kwasu asparaginowego. Obecnie przyjmuje się podział kaspaz na 3 grupy: 1) aktywatory cytokin – kaspazy 1, -4, -5, -11, -12, -13, -14 2) inicjatory szlaku apoptotycznego, kaspazy 8, -9, -10 i ostatnia grupa, 3) efekторы fazy wykonawczej apoptozy, kaspazy -3, -6, -7 [6,28]. Sprawą dyskusyjną jest zaliczenie kaspaz -2 i -12 do enzymów inicjujących apoptozę [29].

Kaspazy występują w komórce w postaci nieaktywnych proenzymów (zymogenów). Aktywacja kaspaz obejmuje hetero- i auto-proteolityczne procesy obróbki prokaspaz, zwykle w miejscach występowania kwasu asparaginowego [28]. Aktywne kaspazy wykonawcze rozszczepiają wiele białek cytoplazmatycznych i jądrowych. Aktywują również topoizomery i endonukleazy [40]. Proteoliza topoizomery I i II, enzymów odpowiedzialnych za stabilizację struktury DNA, powoduje jego wstępną fragmentację do odcinków o długości około 300 000 pz. Wraz z postępowaniem apoptozy DNA degradowany jest do odcinków o długości 30 000–50 000 pz, które podlegają dalszej nukleolizie. Cięcie wiązań fosfodiesterowych jest dokonywane w ten sposób, że reszta fosforanowa pozostaje po stronie 5', zaś grupa hydroksylowa po

stronie 3' łańcucha DNA. Uwolnione fragmenty DNA zakończone 3'-OH można zidentyfikować metodą TUNEL (ang. terminal deoxynucleotydyl transferase mediated d-UTP nick end-labeling), w której stosuje się terminalną deoksynukleotydylotransferazę (TdT). Enzym ten ma zdolność wbudowywania znakowanych nukleotydów, najczęściej dUTP, w miejscach pęknięcia DNA [36]. Rozległa fragmentacja DNA, choć jest typowa dla apoptozy, nie jest niezbędna dla jej przebiegu. W fazie zniszczenia komórki ulegają obkurczeniu w wyniku przeorganizowania nukleo- i cytoszkieletu oraz wypompowania jonów, co ułatwia ich pochłanianie przez sąsiadujące komórki lub fagocyty.

## Apoptoza w zarodkach

---

Apoptoza została stwierdzona w blastocystach mysich [20], bydłęcych [38], małpy [13] oraz ludzkich [22]. Indukowana jest najczęściej działaniem czynnika stresogennego, ale dotyczy również komórek obarczonych anomaliami chromosomowymi, które spontanicznie wchodzi na drogę programowanej śmierci. Przypuszcza się, że apoptoza gwarantuje utrzymanie dobrej jakości komórek wężła zarodkowego w blastocycie poprzez usuwanie komórek uszkodzonych, o nieprawidłowym fenotypie lub niekompetentnych rozwojowo [21]. Z tych powodów liczba komórek i stopień zaawansowania zmian apoptotycznych jest istotnym wskaźnikiem zdolności rozwojowych zarodka [4]. Stwierdzono, że zjawisko apoptozy występuje częściej w blastocystach ssaków uzyskanych w warunkach *in vitro* niż *in vivo* [31]. Doświadczenie Matwee i in. [31] wykazało, że w standardowych warunkach hodowli *in vitro* w zarodkach wczesnych stadiów rozwojowych nie wykrywa się symptomów apoptozy. Pierwsze oznaki jej występowania wykryto w zarodkach 8- i 16-komórkowych. Natomiast zarodki w stadium moruli, wylęgające się lub wylęgłe blastocysty wykazywały typową dla apoptozy fragmentację DNA, którą stwierdzono u odpowiednio 80 i 100% zarodków ocenianych przy użyciu metody tunelowej. Obserwacje te doprowadziły do wniosku, że apoptoza jest zależna od stadium rozwoju zarodka. Zauważono również, że zapoczątkowanie zmian apoptotycznych koreluje z momentem aktywacji genomu zarodka [15, 31].

## Podsumowanie

---

Zjawisko apoptozy odgrywa niezwykle istotną rolę zarówno w oogenezie, jak i w embriogenezie. Zjawisku apoptozy w oocycie towarzyszy przemieszczenie fosfotyloseryny na powierzchnię błony plazmatycznej, spadek potencjału błonowego mitochondriów oraz uwalnianie cytochromu c z ich przestrzeni międzybłonowych, proteoliza białek cytoszkieletu, otoczki jądrowej, białek odpowiedzialnych za organi-

zacje przestrzenną DNA, a także zmiany w zawartości białek pro- i anti-apoptotycznych, tj. oraz zwiększona ekspresja białka Bax i zmniejszona białka Bcl-2. Można przyjąć, że apoptoza jest jednym z głównych czynników ograniczających kompetencje rozwojowe hodowanych in vitro oocytów i zarodków. Biorąc pod uwagę, że rozpoznanie zmian apoptotycznych wymaga dokonania analiz niszczących badany materiał zasadnym wydaje się zbadanie korelacji między molekularnymi, biochemicznymi i morfologicznymi markerami jakości oocytów, które przeznaczane są do dojrzewania in vitro. Poznanie tych relacji może być pomocne w doskonaleniu metody pozaustrojowego dojrzewania oocytów i uzyskiwania pełnowartościowych zarodków zwierząt gospodarskich.

## Literatura

- [1] Adams J.M., Cory S. 1998. The bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *Science* 28: 1322–1326.
- [2] Alm H., Torner H. 2003. Increase of embryo developmental rate in vitro by selection of bovine oocytes before IVM using staining test: preliminary results. Proc. 19th Meeting of AETE, 132 abstr.
- [3] Blankenberg F.G., Tait J.F., Strauss H.W. 2000. Apoptotic cell death: its implications for imaging in the next millennium. *Eur. J. Nucl. Med.* 27: 359–367.
- [4] Brison D.R., Schultz R.M. 1997. Apoptosis during mouse blastocyst formation: evidence for a role for survival factors including transforming growth factor  $\alpha$ . *Biol. Reprod.* 56: 1088–1096.
- [5] Cepero E., Johnson B.W., Boise L.H. 2001. Cloning and analysis of Bcl-2 family genes. *Methods in Cell Biol.* 66: 29–47.
- [6] Chang H.Y., Yang X. 2000. Proteases for cell suicide: functions and regulation of caspases. *Microbiol. Molec. Biol. Rev.* 64: 821–846.
- [7] Crozet N., Dahirel M., Gall L. 2000. Meiotic competence of in vitro grown goat oocytes. *J. Reprod. Fert.* 118: 367–373.
- [8] Cryns V., Yuan J. 1998. Proteases to die for. *Genes Dev.* 12: 1551–1570.
- [9] De Felici M., Di Carlo A., Pesce M., Iona S., Farrace M.G., Piacentini M. 1999. Bcl-2 and Bax regulation of apoptosis in germ cells during prenatal oogenesis in the mouse embryo. *Cell. Death Differ.* 6: 908–915.
- [10] Denecker G., Vercammen D., Declercq W., Vandenabelle P. 2001. Apoptotic and necrotic cell death induced by death domain receptors. *Cell. Mol. Life Sci.* 58: 356–370.
- [11] Desagher S., Martinou J-C. 2000. Mitochondria as the central control point of apoptosis. *Trends Cell Biol.* 10: 369–377.
- [12] Du C., Fang M., Li Y., Wang X. 2000. Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation during apoptosis. *Cell* 102: 33–42.
- [13] Enders A.C., Lantz K.C., Schlafke S. 1990. Differentiation of the inner cell mass of the baboon blastocyst. *Anat. Rec.* 226: 237–248.
- [14] Exley G.E., Tang C.Y., McElhinny A.S., Warner C.M. 1999. Expression of caspase and Bcl-2 apoptotic family members in mouse pre-implantation embryos. *Biol. Reprod.* 61: 231–239.



- [15] Fahrudin M., Otoi T., Karja N.W.K., Mori M., Murakami M., Suzuki T. 2002. Analysis of DNA fragmentation in bovine somatic nuclear transfer embryos using TUNEL. *Reproduction* 124: 813–819.
- [16] Foyouzi-Youssefi R., Arnaudeau S., Borner C., Kelley W.L., Tschopp J., Lew D.P., Demareux N., Krause K.-H. 2000. Bcl-2 decreases the free  $Ca^{2+}$  concentration within the endoplasmic reticulum. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97: 5723–5728.
- [17] Green D.R., Reed J.C. 1998. Mitochondria and apoptosis. *Science* 281: 1309–1312.
- [18] Green D.R. 1995. Early redistribution plasma membrane phosphatidylserine is a general feature of apoptosis regardless of the initiating stimulus. *J. Exp. Med.* 182: 1545–1556.
- [19] Gross A., Yin X.M., Wang K., Wei M.C., Jockel J., Milliman C., Erdjument-Bromage H., Tempst P., Korsmeyer S.J. 1999. Caspase cleaved BID targets mitochondria and is required for cytochrome c release, while Bcl-X<sub>L</sub> prevents this release but not tumor necrosis factor-R1/fas death. *J. Biol. Chem.* 274: 1156–1163.
- [20] Handyside A.H., Hunter S. 1986. Cell division and death in the mouse blastocyst before implantation. *Roux's Arch. Dev. Biol.* 195: 519–526.
- [21] Hardy K. 1997. Cell death in the mammalian blastocyst. *Mol. Hum. Reprod.* 3: 919–925.
- [22] Hardy K., Handyside A.H., Winston R.M. 1989. The human blastocyst: cell number, death and allocation during late preimplantation development in vitro. *Development* 107: 597–604.
- [23] Hengartner M.O. 2000. The biochemistry of apoptosis. *Nature* 407: 770–776.
- [24] Herrick J.R., Brad A.M., Krisher R.L., Pope W.F. 2003. Intracellular adenosine triphosphate and glutathione concentrations in oocytes from first estrous, multi-estrous, and testosterone-treated gilts. *Anim. Reprod. Sci.* 78: 123–131.
- [25] Huppertz B., Frank H.-G., Kaufmann P. 1999. The apoptosis cascade morphological and immunohistochemical methods for its visualization. *Anat. Embryol.* 200: 1–18.
- [26] Jurisicova A., Atenos M., Varmuza S., Tilly J.L., Casper R.F. 2003. Expression of apoptosis-related genes during human preimplantation embryo development: potential roles for the Harakiri gene product and Caspase-3 in blastomere fragmentation. *Mol. Hum. Reprod.* 9: 133–141.
- [27] Kąska-Książkiewicz L. 2004. Pozaustrojowe uzyskiwanie zarodków bydłych – technologia i zastosowanie praktyczne. *Biotechnologia* 1(64): 32–42.
- [28] Kidd V.J., Lahti J.M., Teitz T. 2000. Proteolytic regulation of apoptosis. *Seminars Cell Develop. Biol.* 11: 191–201.
- [29] Kiliańska Z. 2002. Apoptoza organizmów zwierzęcych. W: *Cytobiochemia, Biochemia Niektórych Struktur Komórkowych.* (red.) Kłyszewko-Stefanowicz L. PWN: 772–812.
- [30] Lonergan P., Rizos D., Gutierrez-Adam A., Fair T., Boland M.P. 2003. Oocyte and embryo quality: effect of origin, culture conditions and gene expression patterns. *Reprod. Dom. Anim.* 38: 259–267.
- [31] Matwee C., Betts D.H., King W.A. 2000. Apoptosis in the early bovine embryo. *Zygote* 8: 57–68.
- [32] Morita Y., Perez G.I., Paris F., Miranda S., Ehleiter D., Haimovitz-Friedman A., Fuks Z., Xie Z., Reed J.C., Schuchman E.H., Kolesnick R.N., Tilly J.L. 2000. Oocyte apoptosis is suppressed by disruption of the acid sphingomyelinase gene or by sphingosine-1-phosphate therapy. *Nat. Med.* 6: 1109–1114.

- [33] Morita Y., Maravei D.V., Bergeron L., Wang S., Perez G.I., Tsutsumi O., Taketani Y., Asano M., Horai R., Korsmeyer S.J., Iwakura Y., Yuan J., Tilly J.L. 2001. Caspase-2 deficiency rescues female germ cells from death due to cytokine insufficiency but not meiotic defects caused by ataxia telangiectasia-mutated (Atm) gene inactivation. *Cell. Death Differ.* 8: 614–620.
- [34] Morita Y., Perez G.I., Maravei D.V., Tilly K.I., Tilly J.L. 1999. Targeted expression of Bcl-2 in mouse oocytes inhibits ovarian follicle atresia and prevents spontaneous and chemotherapy induced oocyte apoptosis in vitro. *Mol. Endocrinol.* 13: 841–850.
- [35] Oltvai Z.N., Millman C.L., Korsmeyer S.J. 1993. Bcl-2 heterodimers in vitro with a conserved homology. Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell* 74: 609–619.
- [36] Otsuki Y. 2000. Various methods of apoptosis detection. *Acta Histochem. Cytochem.* 33: 235–241.
- [37] Perez G.I., Knudson C.M., Leykin L., Korsmeyer S.J., Tilly J.L. 1997. Apoptosis associated signalling pathways are required for chemotherapy mediated female germ cell destruction. *Nat. Med.* 3: 1228–1232.
- [38] Plante L., King W.A. 1994. Light and electron microscopic analysis of bovine embryos derived by in vitro and in vivo fertilization. *J. Assist. Reprod. Genet.* 11: 515–529.
- [39] Renvoize C., Roger R., Moulian N., Bertoglio J., Breard J. 1997. Bcl-2 expression in target cells leads to functional inhibition of caspase-3 protease family in human NK cells and lymphokine-activated killer cell granule-mediated apoptosis. *J. Immunol.* 159: 126–134.
- [40] Robertson J.D., Orrenius S., Zhivotovsky B. 2000. Nuclear events in apoptosis. *J. Struct. Biol.* 129: 346–358.
- [41] Roca J., Martinez E., Vázquez J.M., Lucas X. 1998. Selection of immature pig oocytes for homologous in vitro penetration assay with the brilliant cresyl blue test. *Reprod. Fert. Dev.* 10: 479–485.
- [42] Rodríguez-González E., Lopez-Béjar M., Velilla E., Paramio M.T. 2002. Selection of pre-pubertal goat oocytes using the brilliant cresyl blue test. *Theriogenology* 57: 1397–1409.
- [43] Rucker E.B., Dierisseau P., Wagner K.U., Garrett L., Wynshaw-Boris A., Flaws J.A., Hennighausen L. 2000. Bcl-x and Bax regulate mouse primordial germ cell survival and apoptosis during embryogenesis. *Mol. Endocrinol.* 14: 1038–1052.
- [44] Thornberry N.A., Lazebnik Y. 1998. Caspases: enemies within. *Science* 281: 1312–1316.
- [45] Tilly J.L. 2001. Commuting the death sentence: how oocytes strive to survive. *Nature Rev.* 2: 838–848.
- [46] Tsujimoto Y. 2000. Bcl-2 family: Life-or-death switch. *FEBS Lett.* 466: 6–10.
- [47] Verhagen A.M., Ekert P.G., Pakusch M., Silke J., Connolly L.M., Reid G.E., Moritz R.L., Simpson R.J., Vaux D.L. 2000. Identification of DIABLO, a mammalian protein that promotes apoptosis by binding to and antagonizing IAP proteins. *Cell* 102: 43–53.
- [48] Verhoven B., Schlegel R.A., Williamson P. 1995. Mechanisms of phosphatidylserine exposure, a phagocyte recognition signal, on apoptotic lymphocytes. *J. Exp. Med.* 182: 1597–1601.
- [49] Wassarman M. 1988. The mammalian ovum. W: *The Physiology of Reproduction*, New York: Raven Press, (red.) Knobil E., Neil J.D.: 69–102.
- [50] Yang M.Y., Rajamahendran R. 2002. Expression of Bcl-2 and Bax proteins in relation to quality of bovine oocytes and embryos produced in vitro. *Anim. Reprod. Sci.* 70: 159–169.

## **Selected markers of mammal oocytes quality conditioning their ability to in vitro maturation and embryonic development**

---

**Key words:** cattle, oocyte, embryo, IVP, BCB, Bcl-2, Bax, caspases

### **Summary**

An heterogeneous population of oocytes is usually collected from ovaries to be used for several in vitro techniques. Sources of variability may be the age of oocytes, their growth stage, and the apoptosis grade. All these factors might affect an efficiency of in vitro embryo production. Although recently the new selection methods have been introduced, the in vitro embryo production efficiency does not exceed 40%. Much research is being done to determine the useful markers of oocyte developmental competence. The present review briefly describes selected biochemical and molecular markers. Subsequently the status of the members of Bcl-2 family proteins and the caspases (molecular markers) expression and their function in orchestrating cell death in oocyte and embryo were considered.