

LUCYNA KĄSKA

Dojrzewanie oocytów ssaków *in vitro*

Z Zakładu Fizjologii Rozrodu i Sztucznego Unasieniania Zwierząt Instytutu Zootechniki
w Balicach k. Krakowa

Rozwojowi metod transplantacji zarodków u zwierząt laboratoryjnych, a następnie u zwierząt gospodarskich, towarzyszył wzrost zainteresowań badaniami nad dojrzewaniem oocytów *in vitro*. Wprowadzenie transplantacji zarodków zwierząt gospodarskich na skalę praktyczną jest uzależnione od spełnienia szeregu warunków. Jednym z nich jest dysponowanie dostateczną liczbą zarodków. Stosowane obecnie metody superowulacji pozwalają na otrzymanie wielokrotnionej ilości owulacji, niemniej możliwa do uzyskania liczba zarodków jest ograniczona do kilku czy kilkunastu. Jednakże w trakcie uzyskiwania zarodków, ich konserwacji i transplantacji dochodzi do strat pewnej ich liczby, tak więc końcowa efektywność wykorzystania zarodków, jaką jest liczba urodzonego potomstwa, jest stosunkowo niska. W tej sytuacji każde źródło komórek jajowych jest cenne dla dalszego rozwoju transplantacji. Wydaje się, że takim potencjalnym źródłem mogą się stać dojrzewające *in vitro* oocyty. W warunkach fizjologicznych na jajnikach dochodzi do wzrostu znacznej ilości pęcherzyków, z których większość ulega regresji, a tylko nieliczne dojrzewają i owulują. Uzyskiwanie oocytów z rosnących pęcherzyków przed ich atrezją, a następnie hodowla *in vitro*, podczas której oocyty mogą dojrzewać, powiększyłyby znacznie możliwości wykorzystania samic jako dawczyń materiału genetycznego.

Dojrzewanie oocytu oznacza procesy związane z jego wzrostem i przygotowaniem do dalszego rozwoju po zapłodnieniu, co wiąże się z progresją jądra oocytu od stadium diktiotenu pierwszego podziału mejotycznego do metafazy drugiego podziału mejotycznego. Możliwość dojrzewania *in vitro* została po raz pierwszy stwierdzona dla oocytów królika przez Pincusa i Enzmana w 1935 r. (cyt. za 8). Dojrzewanie następowało po umieszczeniu oocytów uzyskanych z pęcherzyków jajnikowych w odpowiednim płynie do hodowli. Autorzy ci sugerowali, że dojrzewanie zarówno *in vivo*, jak i *in vitro* może następować po usunięciu oocytów spod wpływu somatycznych komórek pęcherzyka. Według tej hipotezy komórki pęcherzykowe, szczególnie komórki ziarniste, utrzymują oocyt w stadium pęcherzyka zarodkowego, produkując inhibitor dojrzewania lub zatrzymując niezbędne dla dojrzewania substancje odżywcze. Obecne badania (20, 42) wykazały, że takimi inhibitorami dojrzewania są pewne składniki pęcherzyka Graafa. Oocyty hodowane w izolo-

wanych pęcherzykach nie dojrzewały bowiem w przypadku braku hormonów w środowisku (mysz — 9, krowa i świnia — 12, 13). Pewna ilość inhibitorów dojrzewania zawarta jest również w płynie pęcherzykowym, dlatego też dojrzewało w nim tylko 24% oocytów królika, podczas gdy w hodowli kontrolnej w surowicy 42% (3).

Z szeregu prac wynika, że w odpowiednich warunkach hodowli większość oocytów podejmuje mejozę, chociaż nie zawsze osiągają one metafazę II (tab. 1). Warunkiem rozwoju jest zapewnienie hodowanym *in vitro* oocytom środowiska zbliżonego do fizjologicznego (37, 39) przez dobór właściwego płynu do hodowli i odpowiedniego ciśnienia cząstkowego tlenu (tab. 1).

Oocyty uzyskuje się z pęcherzyków antralnych zazwyczaj w nieznannej fazie cyklu jajnikowego. Istnieje bowiem ścisła korelacja między zdolnością rozwojową oocytów mysich podejmujących mejozę, a występowaniem jamy pęcherzykowej — *antrum* (10), chociaż u szczura obserwuje się podjęcie mejozy w oocytach z pęcherzyków przedantralnych, ale tylko do metafazy I (11). Oocyty pobiera się na ogół razem z otaczającymi je komórkami wzgórką jajonośnego (*cumulus oophorus*), chociaż kontynuacja samego procesu mejozy u ssaków jest niezależna od metabolizmu tych komórek (mysz — 4; szczur — 28, 48). Tak więc oocyty przedowulacyjne, czy nawet oocyty z małych pęcherzyków antralnych izolowane do hodowli, kontynuują spontanicznie mejozę bez udziału hormonów (40), a końcowe dojrzewanie jądra oocytu ssaka jest niezależne od obecności pęcherzyka Graafa (35). Powstaje jednak pytanie czy dojrzałość jądra oocytu jest wystarczającym kryterium dojrzałości całej komórki, warunkującym jej zdolność do zapłodnienia i następującego po nim dalszego rozwoju.

Z dotychczasowych badań wynika, że jedynie oocyty myszy mogą osiągnąć *in vitro* pełną dojrzałość, a następnie rozwijać się po zapłodnieniu i transplantacji do normalnego potomstwa (5, 27). U innych gatunków nie udało się, do tej pory, uzyskać potomstwa po transplantacji oocytów dojrzałych *in vitro*. Niepowodzenia te wynikają bądź to z niemożliwości zapłodnienia tych oocytów, bądź z opóźnienia czy nieprawidłowości w przekształceniu główki plemnika w męskie przedjądrze, co z kolei wiąże się z niedojrzałością osłonki przejrzystej i cytoplazmy oocytu.

Tab. 1. Dojrzewanie *in vitro* oocytów ssaków izolowanych z pęcherzyków Graafa

Gatunek	Płyn do hodowli	Zawartość tlenu %	Oocyty kontynuujące mejozę %	Oocyty osiągnące metafazę II %	Piśmiennictwo
Mysz	zmodyfikowany roztwór Krebsa-Ringera = mKRB	20	95	88	Donahue (7)
Szczur	mKRB	95 potem 5 0 potem 5	brak danych	80 68	Zeilmaker i wsp. (47)
Chomik	roztwór 2 wg Gwatkina i Haidri = GH2	5 10	100 100	100 18	Gwatkin i Haidri (14)
Świnia morska	płyn Parkera z dodatkiem surowicy płodu cielęcego = TC199+FCS	20	90	68	Yanagimachi (46)
Królik	TC199+FCS	20	100	100	Thibault i Gerard (37)
Bydło (cielę)	TC199+FCS	5 20	100 100	100 95—100	Thibault i wsp. (40)
Bydło	surowica płodu cielęcego FCS	5 20	83 brak danych	73 65	Trounson i wsp. (44)
Owca a)	zmodyfikowany roztwór płynu Dulbecco z dodatkiem surowicy owczej = PBS+SS	5	84	39	Moor i Trounson (23)
b)	TC199+FCS	5	62	52	
Świnia	płyn Parkera z dodatkiem surowicy świńskiej = TC199+PS	20 45 95	brak danych	59 44 37	Tsafiri i Channing (41, 42)

Dojrzałość osłonki przejrzystej jest równoznaczna z osiągnięciem przez nią przepuszczalności dla enzymów plemników, a w konsekwencji umożliwia ich przenikanie przez osłonkę. Uważa się, że osłonka przejrzysta jest przepuszczalna dla enzymów plemników, gdy oocyt dojrzewa wewnątrz pęcherzyka, a nie reaguje na nie, gdy jest hodowany poza pęcherzykiem (31). Dojrzałość osłonki przejrzystej oocytów chomika pobieranych w różnym czasie od iniekcji HCG stwierdzano między piątą a szóstą godziną po iniekcji (31). Oocyty szczura muszą również pozostać w pęcherzyku przez przynajmniej 6 godzin od iniekcji HCG, zanim staną się zdolne do zapłodnienia (29).

Jednakże wg Yanagimachi (46) przejście plemników przez osłonkę przejrzystą oocytu świnki morskiej następuje w ciągu ok. 1 godz., a obecność spęczniałych główek plemników stwierdza się w czasie 1,30—2 godz. po penetracji plemników. Również Niwa i wsp. (30) uważają, że przenikanie plemników do oocytu dojrzewającego *in vitro* jest możliwe na każdym etapie dojrzewania, jakkolwiek zapłodnienie nie przebiega prawidłowo w oocytach uzyskanych wcześniej niż 6—8 godzin po podaniu HCG.

Wielu autorów (17, 19, 25, 26, 29, 32, 36, 38, 39) opisuje opóźnienia względnie nieprawidłowości w przekształcaniu główki plemnika w męskie przedjądrze w dojrzewających *in vitro*

oocytach. Thibault (34) uważa, że podczas naturalnego dojrzewania oocytu wewnątrz pęcherzyka w jego cytoplazmie pojawia się czynnik zwany MPGF (the male pronucleus growth factor), który nie występuje w dostatecznej ilości lub nie jest w ogóle syntetyzowany *in vitro*. Dojrzewające *in vivo* oocyty królika osiągną (w ciągu 6 godz. od iniekcji HCG czy porujowego źródła LH) zarówno wrażliwość osłonki przejrzystej na działanie enzymów plemników, jak i dojrzałość cytoplazmatyczną, warunkującą prawidłowe przekształcenie główki plemnika w męskie przedjądrze (38). Podobnie Usui i Yanagimachi (45) używając pozbawionych osłonki przejrzystej oocytów chomika stwierdzili, że czynnik wzrostu męskiego przedjądrza (MPGF) pojawia się tylko *in vivo* ok. 8 godzin od iniekcji HCG. Nasuwa się tutaj pytanie, jaki jest wpływ hormonów gonadotropowych i sterydowych na proces dojrzewania oocytu.

Według Thibault i wsp. (39) oraz Hillensjö i wsp. (16) gonadotropiny działają bezpośrednio na metabolizm komórek wzgórczka. Powodują one zwiększając produkcję progesteronu (28), zwiększając syntezę glikoprotein (24), jak również ułatwiają wymianę międzykomórkową (1). Nie wpływają natomiast na cytoplazmatyczne dojrzewanie oocytów królika, chomika, krowy i kobiety (21, 33, 34, 40). Natomiast niektóre sterydy jajnikowe, dodawane do hodowli oocytów

króliczych i ludzkich, mogą wpływać na osiągnięcie dojrzałości cytoplazmatycznej. Gdy dodawano do hodowli oocytów *in vitro* 17 β -estra-
diol, 17 α -hydroksyprogesteron przekształcenie
główki plemnika w męskie przedjądrze nastę-
powało bezpośrednio po zaplemnieniu (33).

Na uwagę zasługuje fakt, że w badaniach nad
dojrzwaniem *in vitro* oocytów owcy Moor i
Trounson (23) uzyskali jedną blastocystę po
transplantacji 78 oocytów. Podobnie Trounson
i wsp. (44) uzyskali 1 blastocystę po transplan-
tacji 131 dojrzewających *in vitro* oocytów kro-
wy. Powyższe wyniki świadczą więc o możli-
wości osiągnięcia *in vitro* pełnej dojrzałości i dal-
szego rozwoju po zapłodnieniu oocytów, chociaż
efektywność tej metody jest jeszcze minimalna.

W chwili obecnej najbardziej skuteczną me-
todą w badaniach nad dojrzewaniem *in vitro*
jest hodowla oocytów w izolowanych pęcherzy-
kach. Kontynuacja mejozy następuje w tych
warunkach, jeżeli płyn do hodowli zawiera do-
datek hormonów gonadotropowych (mysz — 2;
szczur — 16, 43; chomik — 15, 21; królik —
38; owca — 22, 23; świnia — 6, 12, 18; krowa
— 39, 40). Podczas hodowli *in vitro* wewnątrz
pęcherzyka oocyt osiąga pełną dojrzałość. Ho-
dowane tym sposobem oocyty chomika są zdol-
ne do zapłodnienia (21), a pęcznienie główki
plemnika w oocyte królika następuje bezpo-
średnio po zaplemnieniu (38). Powstałe po za-
płodnieniu zygoty rozwijają się normalnie aż do
urodzenia potomstwa (39, 40). Moor i Trounson
(23) donoszą o urodzeniu jagniąt po transplan-
tacji oocytów hodowanych *in vitro* wewnątrz
izolowanych pęcherzyków. Na uwagę zasługuje
w tych badaniach (23) uzyskanie znacznej już,
bo wynoszącej 40—50%, efektywności trans-
plantacji.

Reasumując należy stwierdzić, że uzyskiwa-
ne wyniki badań nad dojrzewaniem oocytów
nie zezwalają jeszcze na praktyczne ich wyko-
rzystanie. Jednakże dotychczasowe osiągnięcia,
jak również duże zainteresowanie tym zagadnie-
niem, rokuje dalszy postęp w tym zakresie.

Piśmiennictwo

- Anderson E., Albertini D. F.: J. Cell. Biol. 71, 680, 1976.
- Baker T. G., Neal P.: Oogenesis. University Park Press, Baltimore, 1972.
- Chang M. C.: J. Exp. Zool. 128, 379, 1955.
- Cross P. C.: J. Reprod. Fert. 34, 241, 1973.
- Cross P. C., Brinster R. L.: Biol. Reprod. 3, 298, 1970.
- Daquet M. C.: Annls Biol. anim. Biochim. Biophys. 17, 78, 1977.
- Donahue R. P.: J. Exp. Zool. 169, 237, 1968.
- Donahue R. P.: Oogenesis. University Park Press, Baltimore, 1972.
- Edwards R. G.: Nature. 196, 446, 1962.
- Erickson G. F., Sorensen R. A.: J. Exp. Zool. 190, 123, 1974.
- Erickson G. F., Ryan K. J.: J. Exp. Zool. 195, 153, 1976.
- Foote W. D., Thibault C.: Annls Biol. anim. Biochim. Biophys. 9, 329, 1969.
- Foote W. D., Matley D. L., Tibbits F. D.: Proc. West. Sect. Am. Soc. Anim. Sci. 21, 45, 1970.
- Gwatkin R. B. L., Haidri A. A.: Exp. Cell Res. 76, 1, 1973.
- Gwatkin R. B. L., Andersen O. F.: Life Sci. 19, 527, 1976.
- Hillensjö T., Dekel N., Ahren K.: Acta physiol. scand. 96, 558, 1976.
- Hunter R. H. F., Lawson R. A. S., Rowson L. E. A.: J. Reprod. Fert. 30, 325, 1972.
- Hunter R. H. F., Cook B., Baker T. G.: Nature, 260, 156, 1976.

- Iritani A., Niwa K.: J. Reprod. Fert. 50, 119, 1977.
- Jagiello G., Grafeo J., Ducayen M., Prosser R.: Fert. Steril. 28, 476, 1977.
- Mandelbaum J., Plachot M., Thibault C.: Annls Biol. anim. Biochim. Biophys. 17, 389, 1977.
- Müller W. A., Jagiello G.: Fert. Steril. 24, 609, 1973.
- Moor R. M., Trounson A. O.: J. Reprod. Fert. 49, 101, 1977.
- Moricard R.: Rev. Franç. Gyne. 63, 501, 1968.
- Motlik J., Fulka J.: J. Reprod. Fert. 36, 235, 1974.
- Motlik J., Fulka J.: J. Reprod. Fert. 40, 183, 1974.
- Mukherjee A. B.: Nature, 237, 397, 1972.
- Nicosia S. V., Mikhail G.: Fert. Steril. 26, 427, 1975.
- Niwa K., Chang M. C.: J. Reprod. Fert. 43, 435, 1975.
- Niwa K., Miyake M., Iritani A., Nishikawa Y.: J. Reprod. Fert. 47, 105, 1976.
- Plachot M., Mandelbaum J.: C. r. hebd. Séanc. Acad. Sci. 284, 953, 1977.
- Soupart P.: Biology of Spermatozoa. Inacrin. Paris, 1973.
- Soupart P.: Biology of Spermatozoa. Karger, Basle, 1974.
- Thibault C.: Oogenesis. Univ. Park Press, Baltimore, 1972.
- Thibault C.: J. Reprod. Fert. 51, 1, 1977.
- Thibault C., Gerard M.: C. r. hebd. Séanc. Acad. Sci. 270, 2025, 1970.
- Thibault C., Gerard M.: Malformations Congenitales, Mas-son, Paris, 1971.
- Thibault C., Gerard M.: Annls Biol. anim. Biochim. Biophys. 13, 145, 1973.
- Thibault C., Gerard M., Menezo Y.: J. Reprod. Fert. 45, 605, 1975.
- Thibault C., Gerard M., Menezo Y.: Annls Biol. anim. Biochim. Biophys. 15, 705, 1975.
- Tsafirri A., Channing C.: J. Reprod. Fert. 43, 149, 1975.
- Tsafirri A., Channing C.: Endocrinology. 96, 922, 1975.
- Tsafirri A., Lindner H. R., Zor U., Lamprecht S. A.: J. Reprod. Fert. 31, 39, 1972.
- Trounson A. O., Willadsen S. M., Rowson L. E. A.: J. Reprod. Fert. 51, 321, 1977.
- Usui N., Yanagimachi R.: J. Ultrastruct. Res. 57, 276, 1976.
- Yanagimachi R.: J. Reprod. Fert. 38, 485, 1974.
- Zeilmaker G. H., Hulsmann-Wensinck F., Verhamme C. M.: J. Reprod. Fert. 29, 151, 1972.
- Zeilmaker G. H., Verhamme C. M.: Biol. Reprod. 11, 145, 1974.

Adres autora: mgr Lucyna Katska, ul. Zankowa 12/4, 30-301 Kraków.

WILLIAMS M. R., MILLAR P.: Zmiany poziomu IgG₂ w zależności od wieku u krów w Wielkiej Brytanii. (Changes in IgG₂ levels with age in British cattle). Res. vet. Sci. 25, 82—85, 1978 (1).

Określono poziom IgG₁, IgG₂ i IgM w surowicy 40 cieląt w wieku 2—13 miesięcy w 141 surowicach pochodzących od jałówek i starszych cieląt oraz w surowicach 121 krów i 102 buhajów. Poziom poszczególnych klas immunoglobulin określono metodą radialnej immunodiffuzji wg Williama i wsp. Stwierdzono wzrost poziomu IgG₁ w surowicach cieląt i krów wraz z wiekiem. Poziom IgG₂ u cieląt 2—13 miesięcznych wynosił 3.89±1.52 mg/ml, u dorosłych krów 10.91±0.475 mg/ml, u buhajów 3.30±0.272 mg/ml. Około 300% wzrost poziomu IgG₂ stwierdzono u krów 8-letnich w porównaniu do krów jednorocznych. W tym okresie czasu poziom IgG₁ wzrósł jedynie o 20%. U buhajów poziom IgG₂ wahał się w granicach 1—35 mg/ml.

G.

BALL P. J. H.: Zależność między wiekiem i okresem ciąży a występowaniem zamierania zarodków u bydła mlecznego. (The relationship of age and stage of gestation to the incidence of embryo death in dairy cattle). Res. vet. Sci. 25, 120—122, 1978 (1).

W próbkach mleka pobranych od krów, które wycieliły się w jesieni oznaczano poziom progesteronu w odstępach 3 tygodni przez okres 2 lat tj. od momentu wycielenia do chwili stwierdzenia ciąży badaniem klinicznym. Każdego roku przebadano 100 krów. W okresie 2 lat stwierdzono u 42 krów zamieranie zarodków między 17—70 dniem ciąży. Najwyższy odsetek zamierania zarodków występował 35 dnia po sztucznej inseminacji. U krów starszych zamieranie zarodków jest częstsze. Występowało ono jedynie u 3.3% krów inseminowanych po pierwszej laktacji i u 15.1% krów inseminowanych po 4 lub większej ilości laktacji.

G.