

DOROTA SŁONINA, ADAM OKÓLSKI

Wpływ komórek ziarnistych i komórek osłonki wewnętrznej na dojrzewanie *in vitro* oocytów klaczy

Katedra Rozrodu Zwierząt Wydziału Zootechnicznego AR, Al. Mickiewicza 24/28, 30-059 Kraków

Summary

Influence of the granulosa cells and theca interna cells on the *in vitro* maturation of equine oocytes

The ovaries from 173 mares were collected at the time of slaughter from September 1991 to September 1992 and follicles (5–20 mm in diameter) were isolated and dissected to obtain oocytes for culture. 669 oocytes were subjected to one of four different culture treatments: Gr. 1-medium with oocytes, Gr. 2-medium plus 3×10^6 /ml granulosa cells plus oocytes, Gr. 3-medium plus 0.3×10^6 /ml theca interna cells plus oocytes, Gr. 4-medium plus granulosa and theca interna plus oocytes. The oocytes were cultured for 24, 30, 36, 42 and 48 hrs. After culture cumulus cells the expansion and stage of nuclear maturation was determined. The majority of oocytes reached full nuclear maturation after 30 hrs. The best results — full dispersion of cumulus cells in 96% and 97% of the oocytes and metaphase II in 75% and 77% of the oocytes — were obtained after 36 and 42 hrs' culture of oocytes with theca interna cells, respectively.

Dotychczasowe próby uzyskania ciąży po zapłodnieniu *in vitro* oocytów klaczy dojrzewających w warunkach *in vitro* nie powiodły się. Przyczyną tego jest prawdopodobnie niepełna dojrzałość oocytów, szczególnie ich ooplazmy w proponowanych systemach hodowli. Prawidłowe dojrzewanie oocytów *in vivo* zależy od „sygnałów” przesyłanych pomiędzy komórkami pęcherzykowymi i oocytem (19). Znaczenie komórek wzgórka jajonośnego dla dojrzewania rozwoju oocyta zostało potwierdzone przez wielu autorów (4, 14). U bydła i owiec współhodowla oocytów z komórkami ziarnistymi pęcherzyka zwiększa zdolność do zapłodnienia i rozwoju zarodkowego (5, 17).

Pierwsza ciąża po zapłodnieniu *in vitro* oocytów przedowulacyjnych klaczy (12) i udany rozwój zarodkowy po wprowadzeniu oocytów do pęcherzyków przedowulacyjnych (7) sugeruje, że oocyty klaczy mogą znaleźć lepsze warunki dojrzewania *in vitro* we współhodowli z komórkami pęcherzykowymi.

Celem doświadczenia było określenie wpływu komórek ziarnistych i komórek osłonki wewnętrznej na dojrzewanie *in vitro* oocytów klaczy, w tym na dyspersję wzgórka jajonośnego i stan dojrzałości jądra.

Materiał i metody

Do badań wykorzystano jajniki pochodzące od 173 klaczy po uboju. Pęcherzyki o średnicy 5–20 mm izolowano, myto i rozcinano na szalkach Petriego. Pod mikroskopem stereoskopowym (przy powiększeniu 25 $\times$) oocyty wyszukiwano, oddzielano od wewnętrznej powierzchni ściany pęcherzyka, kilkakrotnie przepłukiwano i klasyfikowano na podstawie wyglądu wzgórka jajonośnego i ooplazmy. Tylko oocyty z pełnym, zwartym wzgórką i jednorodną ooplazmą akceptowano do hodowli.

Komórki ziarniste pozyskiwano z pęcherzyków o średnicy 25–30 mm i przygotowywano wg metody opisanej przez Channing (1). Osłonkę wewnętrzną izolowano z tych samych pęcherzyków co komórki ziarniste. Po oddzieleniu od warstwy osłonki zewnętrznej przepłukiwano ją i traktowano

trypsyną w celu uzyskania izolowanych komórek wg metody podanej przez Stokłosową i wsp. (18).

Do płukania oocytów i komórek pęcherzykowych użyto pożywki TCM-199 z HEPES-em wzbogacone 16% FCS. Do inkubacji użyto pożywki TCM-199 uzupełnionej 20% FCS i 2,5 μ g/ml FSH, 2,5 μ g/ml LH, 1 μ g/ml E_2 , 35 μ g/ml insuliny, 70 μ g/ml kwasu askorbinowego i 50 μ g/ml piroglonianu Na (wszystkie odczynniki firmy Sigma).

Pozyskane oocyty hodowano *in vitro* wg następującego schematu: grupa 1 — oocyty bez dodatku komórek pęcherzykowych, grupa 2 — z dodatkiem 3×10^6 /ml komórek ziarnistych, grupa 3 — z dodatkiem 0.3×10^6 /ml komórek osłonki wewnętrznej, grupa 4 — z dodatkiem 3×10^6 /ml komórek ziarnistych i 0.3×10^6 /ml komórek osłonki wewnętrznej. Oocyty inkubowano przez 24, 30, 36, 42 i 48 godz. w atmosferze 5% CO_2 w powietrzu w temp. 38,5°C.

Kryteriami oceny dojrzałości oocytów po hodowli były: stopień dyspersji wzgórka jajonośnego i stan jądra. Wzgórek jajonośny klasyfikowano jako zdyspersowany, gdy widać było wyraźne rozluźnienie przestrzeni międzykomórkowych i niedyspersowany. Oocyty po oczyszczeniu z przyległych komórek, utrwaleniu w roztworze kwasu octowego i etanolu (1:3) przez 24 godz. barwiono 1% cresiną. Stan dojrzałości jądra oceniano w mikroskopie kontrastowo-fazowym i klasyfikowano w zależności od konfiguracji chromosomowej jako: stadium pęcherzyka zarodkowego, metafazy I, metafazy II oraz zdegenerowane i niezidentyfikowane.

Do statystycznej analizy wyników użyto testu Chi-kwadrat.

Wyniki i omówienie

Ogółem z 1081 pęcherzyków jajnikowych wyizolowano 1027 oocytów, średnio 6 oocytów od klaczy. Procent oocytów uzyskanych w tym doświadczeniu metodą izolowania (95%) znacznie przewyższa procent oocytów (34%, 46%) uzyskiwanych metodą aspiracji (6, 11). Pomimo tak dużego uzysku oocytów tylko 669 (65%) z nich zakwalifikowano do hodowli. Dyspersję komórek wzgórka jajonośnego oceniono we wszystkich hodowanych oocytach. W grupie I po każdym czasie hodowli oceniono średnio 64 oocyty, w grupie II — 27 oocytów, w grupie III — 28 oocytów i w grupie IV — 16 oocytów. Ocenę stanu dojrzałości jądra przeprowadzono w 281 oocytach, w tym 79 inkubowanych bez dodatku komórek pęcherzykowych, 71 z komórkami ziarnistymi, 68 z komórkami osłonki wewnętrznej i 63 hodowanych z obydwojema rodzajami komórek. Pozostałe oocyty wykorzystano do innych doświadczeń.

Po 24 godzinach hodowli pełna dyspersję wzgórka jajonośnego uzyskało 9%, 10%, 35% i 50% oocytów inkubowanych odpowiednio bez dodatku komórek, z komórkami ziarnistymi, z komórkami osłonki wewnętrznej oraz z komórkami ziarnistymi i osłonki wewnętrznej. Wydłużenie czasu hodowli do 36 godz. spowodowało wzrost liczby oocytów z pełną dyspersją wzgórka jajonośnego w grupie 1, 2 i 3 ($p < 0,05$) i w grupie 4 ($p > 0,05$) (ryc. 1). Najwyższy procent oocytów z rozproszonymi komórkami wzgórka jajonośnego uzyskano po 36 i 42 godz. we współhodowli z komórkami osłonki wewnętrznej (odpowiednio 96% i 97%). Ocena stopnia dyspersji komórek wzgórka jajonośnego jest subiektywna. Jakość wzgórka jajonośnego zależy od metody

pozyskania oocyty, wielkości pęcherzyka i stopnia atrezji. Ten sposób pozyskiwania oocytów pozwala ograniczyć wtórne uszkodzenia wzgórka jajonośnego do 11%, podczas gdy przy metodzie aspiracji nawet 71% i więcej pozyskanych oocytów może być uszkodzonych (6, 11). Podobnie 80—100% oocytów z pełną dyspersją wzgórka uzyskali Zhang i wsp. (22) i Willis i wsp. (20), którzy inkubowali oocyty w pożywkach bez dodatku komórek pęcherzykowych.

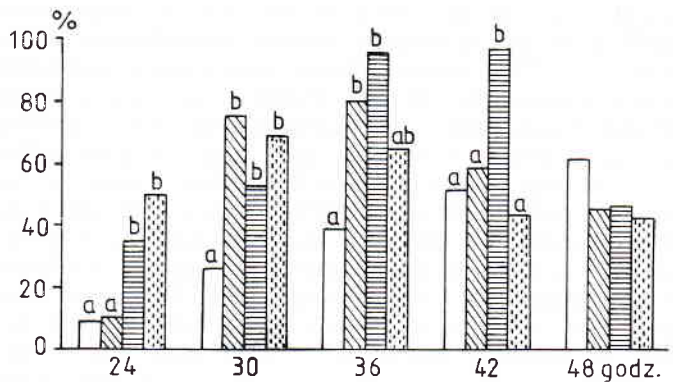
W grupie oocytów hodowanych bez dodatku komórek zauważono systematyczny wzrost procentu oocytów z dyspersją wzgórka jajonośnego wraz z wydłużaniem czasu hodowli do 48 godz. Jednocześnie oocyty tej grupy w czasie 24—42 godz. inkubacji wykazywały najslabiej zdyspersowany wzgórek jajonośny w porównaniu z pozostałymi grupami oocytów ($p < 0,05$) (ryc. 1).

Po wydłużeniu czasu hodowli oocytów z komórkami pęcherzykowymi do 48 godz. zauważono ponowne zbijanie się komórek wzgórka jajonośnego. Podobne zjawisko u bydła zaobserwował Hyttel i wsp. (8), gdzie po przedłużeniu czasu hodowli do 40—48 godz. komórki wzgórka ulegały spłaszczeniu i ściśle przylegały do osłonki przejrzystej. Ponowne zbicie komórek może pozbawiać oocyty zdolności do zapłodnienia, gdyż plemniki mogą być fagocytowane przez komórki wzgórka jajonośnego (8).

W tabeli 1 przedstawiono procent oocytów, które osiągnęły metafazę I i metafazę II oraz procent oocytów zdegenerowanych i niezidentyfikowanych w różnych czasach i systemach hodowli. Cytologiczna ocena jądra 22 oocytów przed rozpoczęciem hodowli wykazała, że 70% oocytów było w stadium pęcherzyka zarodkowego, 23% w stadium aktywacji (GVBD) i 7% oocytów było niezidentyfikowanych. Willis i wsp. (21) podaje, że 75% oocytów pozyskanych z pęcherzyków o średnicy poniżej 25 mm było w stadium pęcherzyka zarodkowego, 14% oocytów wznowiło mejozę (GVBD + + met. I), natomiast 8% było w stadium metafazy II.

W przeprowadzonych przez nas badaniach po 24 godz. hodowli większość oocytów wszystkich grup osiągnęła stadium metafazy I bez widocznej dyspersji komórek wzgórka jajonośnego (tab. 1, ryc. 1). W tym czasie tylko 18% oocytów hodowanych w pożywce bez komórek pęcherzykowych, 7% oocytów inkubowanych w pożywce z komórkami ziarnistymi, 33% z komórkami osłonki wewnętrznej i 16% z obydwojma rodzajami komórek było w stadium metafazy II.

Wydłużenie czasu hodowli do 30 godz. spowodowało zwiększenie liczby oocytów z pełną dojrzałością jądra we wszystkich systemach hodowli (ryc. 2). Procent

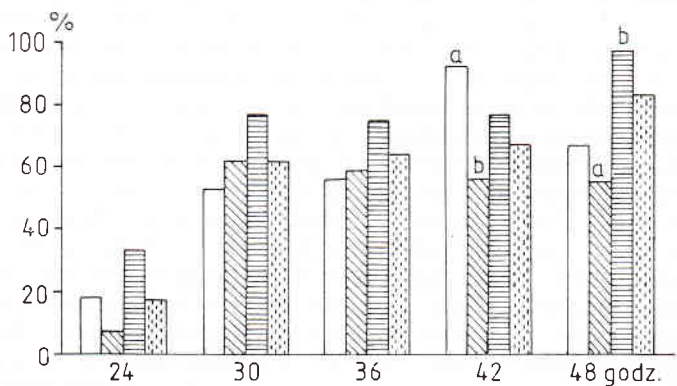


Objaśnienia:

- Oocyty (n=319)
- Oocyty+kz (n=133)
- Oocyty+kow (n=138)
- Oocyty+kz+kow (n=79)

Ryc. 1. Wpływ czasu i systemu hodowli na dyspersję wzgórka jajonośnego (%)

Objaśnienia: kz = komórki ziarniste; kow = komórki osłonki wewnętrznej; a, b = istotność różnic na poziomie ($p < 0,01$) pomiędzy wartościami w tym samym czasie hodowli.



Objaśnienia:

- Oocyty (n=79)
- Oocyty+kz (n=71)
- Oocyty+kow (n=68)
- Oocyty+kz+kow (n=63)

Ryc. 2. Wpływ czasu i systemu hodowli na stan dojrzałości oocytów do metafazy II (%)

Objaśnienia: kz = komórki ziarniste; kow = komórki osłonki wewnętrznej; a, b = istotność różnic na poziomie ($p < 0,05$) pomiędzy wartościami w tym samym czasie hodowli.

Tab. 1. Oocyty w różnym stadium rozwoju w zależności od czasu i systemu hodowli (%)

Czas hodowli (godz.)	Oocyty			Oocyty + komórki ziarniste			Oocyty + komórki osłonki wewn.			Oocyty + ziarn. i osłonki wewn.		
	M I	M II	ZN	M I	M II	ZN	M I	M II	ZN	M I	M II	ZN
24	59 (10/17)	18 ^a (3/17)	23 (4/17)	79 (11/14)	7 ^a (1/14)	14 (2/14)	56 (10/18)	33 ^a (6/18)	11 (2/18)	42 (5/12)	17 ^a (2/12)	41 (5/12)
30	41 (7/17)	53 ^b (9/17)	6 (1/17)	23 (3/13)	62 ^b (8/13)	15 (2/13)	23 (3/13)	77 ^b (10/13)	0 (0/13)	23 (3/13)	62 ^b (8/13)	15 (2/13)
36	22 (4/18)	56 ^b (10/18)	22 (4/18)	18 (3/17)	59 ^b (10/17)	23 (4/17)	0 (0/12)	75 ^b (9/12)	25 (3/12)	18 (2/11)	64 ^b (7/11)	18 (2/11)
42	0 (0/12)	92 ^c (11/12)	8 (1/12)	19 (3/16)	56 ^b (9/16)	25 (4/16)	8 (1/13)	77 ^b (10/13)	15 (2/13)	0 (0/15)	67 ^b (10/15)	33 (5/15)
48	13 (2/15)	67 ^{bc} (10/15)	20 (3/15)	0 (0/11)	55 ^b (6/11)	45 (5/11)	0 (0/12)	100 ^b (12/12)	0 (0/12)	0 (0/12)	83 ^b (10/12)	17 (2/12)

Objaśnienia: M I — metafaza I, M II — metafaza II, ZN — zdegenerowane i niezidentyfikowane, a, b, c — istotność różnic na poziomie ($p < 0,05$) pomiędzy wartościami w tej samej kolumnie.

oocytów osiągających metafazę II w każdej grupie był podobny po 36, 42 i 48 godz. hodowli. W proponowanych przez nas systemach hodowli zdecydowana większość (53–77%) oocytów klaczy osiąga pełną dojrzałość jądra w czasie 30–36 godz. Podobne rezultaty uzyskali Zhang i wsp. (22) i Shabpareh i wsp. (13). Zbliżony procent oocytów w stadium met. II po 24 godz. (48%) i po 48 godz. (45%) uzyskali Desjardins i wsp. (3), po 15 godz. (48%) i 32 godz. (52%) Willis i wsp. (21) i po 24–48 godz. Del Campo i wsp. (2). Autorzy ci pożytkiwali oocyty z pęcherzyków o różnej wielkości i prawdopodobnie różnej dojrzałości. Być może czas potrzebny oocytom do pełnej dojrzałości jądrowej zależy od wielkości pęcherzyka. Oocyty pochodzące z pęcherzyków o większej średnicy ponad 20 mm mogą znajdować się na dalszym etapie rozwoju meiotycznego i w krótszym czasie hodowli *in vitro* dochodzą do metafazy II.

W przeprowadzonym eksperymencie dodanie do hodowli komórek pęcherzykowych nie wpłynęło istotnie ($p > 0,05$) na wzrost liczby oocytów z metafazą II (ryc. 2). Stwierdzono, że komórki ziarniste pobrane z pęcherzyków o 30 mm średnicy i dodane do hodowli w koncentracji $3 \times 10^6/\text{ml}$ nie blokowały wznowienia mejozy. Procent oocytów zdegenerowanych i niezidentyfikowanych wynosił od 0% do 41%.

Najwyższy procent oocytów w stadium metafazy II (ryc. 2) i z pełną dyspersją wzgórka jajonośnego (ryc. 1) uzyskano przy współhodowli z komórkami osłonki wewnętrznej. Interpretacja tego zjawiska jest trudna na tym etapie badań. Być może, podobnie jak w warunkach *in vivo* współhodowla oocytów z komórkami ziarnistymi i komórkami osłonki wewnętrznej wpływa na dojrzewanie oocytów poprzez regulacyjne mechanizmy związane z produkcją hormonów i innych czynników. W mechanizmie kontrolującym dojrzewanie pęcherzyka równie ważne jest znaczenie komórek pęcherzykowych, co i gonadotropin przysadkowych (9). W pęcherzykach klaczy komórki osłonki wewnętrznej są głównymi miejscem syntezy androgenów, które po przedostaniu się do warstwy ziarnistej ulegają w jej komórkach aromatyzacji do estrogenów (15). Hormony gonadotropowe FSH i LH oraz estradiol były obecne w pożywce hodowlanej. Być może hodowane *in vitro* komórki osłonki wewnętrznej pod wpływem egzogenego LH syntetyzują androgeny, które są aromatyzowane do estradiolu w komórkach ziarnistych. Te syntetyzowane substancje wpływają na oocyty poprzez wewnątrzkomórkowe połączenia. Ponieważ wiadomo, że komórki osłonki wewnętrznej klaczy nie są zdolne do aromatyzacji, to być może androgeny produkowane przez te komórki wpływają na wznowienie lub kontynuację dojrzewania oocytów zwłaszcza na dyspersję wzgórka jajonośnego. Ostatnie wyniki Sirotkina (16) popierają taką teorię. Według tego autora duże stężenie estradiolu hamuje dojrzewanie oocyty. W naszych doświadczeniach wyniki uzyskane w hodowli oocytów z komórkami ziarnistymi i komórkami osłonki wewnętrznej, a więc w warunkach odpowiadających za syntezę estradiolu, potwierdzają tę teorię. W tym systemie hodowli, w przeciwieństwie do współhodowli oocytów z komórkami osłonki wewnętrznej, stymulacja dyspersji wzgórka nie była tak widoczna. Moor i Trounson (10) sugerują natomiast, że początkowy wysoki poziom estradiolu jest konieczny do cytoplazmatycznego dojrzewania wymaganego następnie do rozwoju zarodkowego. Nie wiadomo, czy estradiol z hodowlanej pożywki może pełnić tę rolę w warunkach *in vitro*, gdyż

nie uzyskano jeszcze ciąży po zapłodnieniu *in vitro* oocytów klaczy, które dojrzewały w warunkach *in vitro*. Być może estradiol syntetyzowany w komórkach użytych do współhodowli z oocytami odpowiada za tę regulację. Czy system współdziałania pomiędzy komórkami osłonki wewnętrznej, komórkami ziarnistymi i oocytom istnieje w warunkach *in vitro* i czy ma wpływ na dojrzewanie jądra i cytoplazmy — będzie można się przekonać uzyskując powtarzalne ciąży i zarodki po zapłodnieniu *in vitro* oocytów klaczy hodowanych w warunkach *in vitro*.

Wnioski

- Większość oocytów klaczy w warunkach *in vitro* osiąga pełną dojrzałość jądra po 30 godz. hodowli.
- Najlepsze rezultaty uzyskuje się po 36 i 42 godz. hodowli oocytów w obecności komórek osłonki wewnętrznej pęcherzyka; pełną dyspersję wzgórka jajonośnego stwierdzono odpowiednio u 96% i 97% oocytów i stadium metafazy II u 75% i 77% oocytów.

Piśmiennictwo

- Channing G. P.: Nature 210, 1266, 1966.
- Del Campo M. R., Donoso M. X., Parrish J. J.: Theriogenology 37, 230, 1992.
- Desjardins M., King W. A., Bousquet D.: Theriogenology 35, 167, 1985.
- Fukui Y.: Mol. Reprod. Dev. 26, 40, 1990.
- Fukui Y., Ono H.: J. Reprod. Fert. 86, 531, 1989.
- Hinrichs K.: Theriogenology 36, 157, 1991.
- Hinrichs K., DiGiorgio L. M.: J. Reprod. Fert. Suppl. 44, 369, 1991.
- Hyttel P., Xu K. P., Smith S., Greve T.: J. Reprod. Fert. 78, 615, 1986b.
- Kotsuji F., Kamitani N., Goto K., Tomimaga T.: Biol. Reprod. 43, 726, 1990.
- Moor R. M., Trounson A. O.: J. Reprod. Fert. 49, 101, 1977.
- Okolski A., Babusik P., Tischner M., Lietz W.: J. Reprod. Fert. Suppl. 35, 191, 1987.
- Palmer E., Magistrini M., Bézard J., Duchamp G.: C. R. Acad. Sci. 310, 71, 1990.
- Shabpareh V., Squires E. L., Jaško D. J.: Theriogenology 37, 298, 1992.
- Shiyoa Y., Kuwayama M., Fukushima M., Iwasaki S.: Theriogenology 30, 489, 1988.
- Sirois J., Kimmich T. L., Fortune J. E.: Endocrinology 128, 1159, 1991.
- Sirotkin A. V.: J. Ster. Biochem. Mol. Bio. 41, 855, 1992.
- Staigmiller R. B., Moor R. M.: Gamete Res. 9, 221, 1984.
- Stokłowska S., Bahr J., Gregoraszczuk E.: Biol. Reprod. 19, 712, 1978.
- Thibault C., Szöllösi D., Gerard M.: Reprod. Nutr. Dev. 27, 865, 1987.
- Willis P., Fayrer-Hosken R. A., Caudle A. B.: Theriogenology 33, 345, 1990.
- Willis P., Caudle A. B., Fayrer-Hosken R. A.: Theriogenology 35, 294, 1991.
- Zhang Y. Y., Boule M. S., Allen W. R., Gall C.: Equine Vet. J. Suppl. 8, 101, 1989.

Adres autora: mgr inż. Dorota Słonina, os. Jagiellońskie 32/12, 31-836 Kraków

CATCHPOLE J., NORTON C. C., GREGORY M. W.: Uodpornianie jagniąt przeciwko kokcydiozie. (Immunisation of lambs against coccidiosis). Vet. Rec. 132, 56–59, 1993 (3)

Dwie grupy bliźniaczych jagniąt utrzymywanych z matkami na pastwisku zarażono 10 tys. oocyst *Eimeria crandallii* i 10 tys. oocyst *E. ovinoidalis* w dniu urodzenia (grupa 2), w dniu urodzenia, a następnie trzykrotnie w odstępach tygodniowych (grupa 3) lub 1000 oocyst *E. crandallii* i 1000 *E. ovinoidalis* trzykrotnie w odstępach tygodniowych poczynając od wieku 7 dni (grupa 4). Wszystkie owce eksperymentalne i z grupy kontrolnej (niezarażone) zarażono w wieku 21 dni życia 100 tys. oocyst każdego gatunku *Eimeria*. Nie zauważono żadnych objawów ubocznych po immunizacji. Jedynie *E. crandallii* rozwijała się w organizmie noworodków. Zarażenie spowodowało padnięcie 80% jagniąt w grupie kontrolnej i 20% w grupie jagniąt, które otrzymały jedną dawkę *Eimeria* w dniu wykotu. W pozostałych grupach rozwinęła się silna odporność, której nie przełamało zarażenie eksperymentalne. Jagnięta z grupy 4 w wieku 9 tygodni życia miały najwyższą masę.