

MAŁGORZATA SZLACHTA, MARIAN TISCHNER

# Morfologia i rozmieszczenie pęcherzyków przedjamistych w jajnikach klaczy

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

Szlachta M., Tischner M.

## Morphology and distribution of preantral follicles in mare ovaries

### Summary

No offspring have yet been obtained in horses either from oocytes collected from preantral follicles or other ones maturing *in vitro*. The available literature does not provide any detailed description of the ovary with respect to distribution and morphology of the ovarian follicles. The purpose of the study was to define the location and histomorphology of preantral follicles in the mare ovary in order to find if it is then possible to isolate and cultivate it. The investigations were carried out on some histological samples of longitudinal and transversal sections of mare ovaries which were collected from a 6-year-old anoestrus mare at 10 minutes after slaughter. From among 821 preantral follicles, which were located and evaluated, 567 came from transversal sections and 256 from the longitudinal ones. The preantral follicles were found in all parts of the ovary stroma. In a single histological preparation from a transversal section an average number of 70,5 preantral follicles were found and in a longitudinal one there were 84,7 preantral follicles the size of 35,2 and 45  $\mu\text{m}$ , respectively. The follicles mostly occurred singly (54,7%) or in groups of 2 to 7 (45,3%). Among all the preantral follicles 31,2% were defined as atretic, 30,6% were found in the group of the primordial ones and 63,6% in the secondary ones. The percentage of atretic follicles increased with the stage of follicular development. Isolation of the follicles from ovary, their culture and *in vitro* maturation still remains a problem. The present study indicates that samples collected from any part of the ovarian stroma can be used for this purpose.

Jajniki noworodka niezależnie od gatunku zawierają setki tysięcy oocytów znajdujących się w pęcherzykach w różnych stadiach rozwoju. Najwięcej jest pęcherzyków przedjamistych, do których zaliczane są pęcherzyki pierwotne, pęcherzyki pierwszego i drugiego rzędu oraz proporcjonalnie mniejsza liczba pęcherzyków jamistych (19, 21).

Tylko niewielka liczba pęcherzyków pierwotnych rozpoczyna dalszy rozwój, przekształcając się w pęcherzyki pierwszorzędowe. Pozostałe nie rozwijają się i mogą pozostać w stadium pęcherzyka pierwotnego przez kilka lat (17). Większość pęcherzyków (około 99,9%) ulega atrezji w różnych stadiach rozwoju. Ostatnie stadium przedowulacyjne osiąga bardzo małą liczbę pęcherzyków (12, 14, 19). W trakcie wzrostu pęcherzyków następuje również wzrost oocytów oraz przekształcanie się płaskich komórek nabłonkowych otaczających oocyt w kuboidalne komórki ziarniste, które tworzą następnie błonę ziarnistą (*membrana granulosa*). W tym czasie z glikoproteinowej wydzieliny komórek otaczających oocyt powstaje również osłonka przejrzysta (*zona pellucida*). Pęcherzyki takie określane są jako drugorzędowe (3, 7, 19). W trakcie dalszego rozwoju komórki zrębu otaczające pęcherzyk drugorzędowy przekształcają się w komórki osłonki wewnętrznej (*theca interna*) i osłonki zewnętrznej (*the-*

*ca externa*) (20). Podczas wzrostu pęcherzyka w warstwie ziarnistej pojawiają się początkowo niewielkie przestrzenie wypełnione płynem pęcherzykowym (*liquor folliculi*), które rozrastają się i łączą tworząc jedną jamkę pęcherzykową (*antrum*) (19). U konia wyraźną jamkę obserwuje się w pęcherzykach o średnicy 220-280  $\mu\text{m}$ , u bydła 115-280  $\mu\text{m}$  (4, 14). Do wnętrza jamki pęcherzyka uwypukla się wzgórek jajonośny (*cumulus oophorus*) zawierający oocyt otoczony komórkami wieńca promienistego (*corona radiata*). Na skutek gromadzenia się płynu pęcherzykowego jamka powiększa się, aż do osiągnięcia wymiarów pęcherzyka przedowulacyjnego właściwych dla danego gatunku zwierząt. W pęcherzyku przedowulacyjnym konia jamka stanowi 95% całego pęcherzyka (4). Rozmiary pęcherzyka dominującego (przedowulacyjnego) u tego gatunku wynoszą około 3,5 do 6 cm. Owulacja u klaczy następuje zawsze w dołku owulacyjnym, gdyż warstwa naczyńniowa jajnika położona jest zewnętrznie, natomiast cały jajnik z wyjątkiem dołka owulacyjnego pokryty jest otrzewną.

W ostatnich latach znacznie wzrosło zainteresowanie pozyskiwaniem i hodowlą *in vitro* pęcherzyków przedjamistych różnych gatunków zwierząt. W przypadku samic, u których nie można otrzymać potomstwa z oocytów uzyskanych z dojrzałych pęcherzyków

jajnikowych istnieje możliwość izolacji pęcherzyków przedjamistych i ich hodowli w warunkach *in vitro* aż do momentu osiągnięcia przez oocyt dojrzałości. Metody te stwarzają szansę pełniejszego wykorzystania cennych osobników, a także uzyskiwania potomstwa od niedojrzałych płciowo samic.

U myszy metody uzyskiwania i hodowli pęcherzyków przedjamistych zostały opracowane już do tego stopnia, że możliwe było doprowadzenie do owulacji w warunkach *in vitro* oraz zapłodnienie uzyskanych w ten sposób oocytów (2, 5, 6, 19, 20). W ostatnich latach podjęto również szereg podobnych badań u innych gatunków zwierząt, głównie bydła (7–14, 16), w tym u płodów bydłowych (22) oraz świń (19).

U koni nie udało się jednak dotychczas uzyskać potomstwa z oocytów uzyskanych z pęcherzyków jamistych poddanych dojrzewaniu w warunkach *in vitro*. Nie natrafiono również w dostępnej literaturze na szczegółowy opis jajnika uwzględniający rozmieszczenie i cechy morfologiczne pęcherzyków jajnikowych. Wydawało się zatem celowe podjęcia badań nad lokalizacją oraz właściwościami histomorfologicznymi oocytów i pęcherzyków przedjamistych występujących w jajnikach klaczy. Obserwacje te być może przydadzą się zarówno do lepszego poznania budowy jajnika klaczy jak i dalszego postępu badań nad zapłodnieniem *in vitro*.

### Materiał i metody

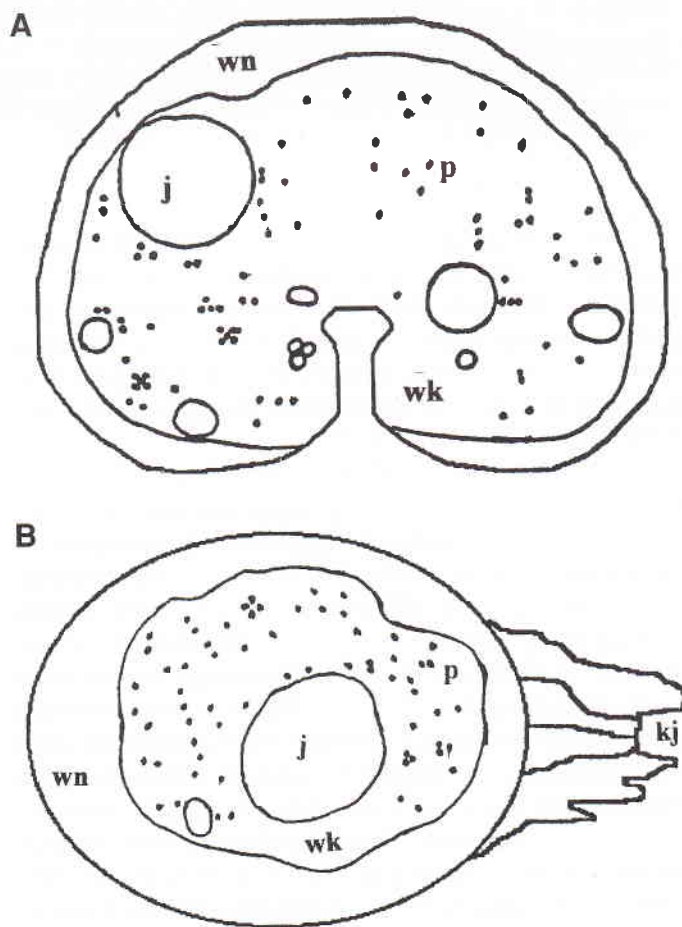
Preparaty histologiczne wykonano z jajników pobranych 10 minut po uboju klaczy w wieku około 6 lat, będącej w fazie *anestrus*. Jeden jajnik przecinano poprzecznie na dwie części (przekroje poprzeczne) natomiast drugi podłużnie (przekroje podłużne) i utrwalano w 10% formalinie przez sześć tygodni. Preparaty histologiczne sporządzano w pracowni histopatologicznej Zakładu Neurofizjologii Collegium Medicum UJ w Krakowie. Po odwodnieniu jajników w szeregu alkoholi, osadzano je w bloczkach parafinowych, cięto na skrawki o grubości 10  $\mu\text{m}$ , barwiono hematoksyliną i eozyną (13). Z pojedynczego jajnika wykonywano 3 skrawki z przekrojów podłużnych i 8 z przekrojów poprzecznych. Następnie przy użyciu mikroskopu wyszukiwano kolejno, w każdej części preparatu pęcherzyki przedjamiste, dokonywano oceny i pomiarów z dokładnością do 2,5  $\mu\text{m}$ . Wybrane pęcherzyki fotografowano.

Do pęcherzyków określanych jako przedjamiste zaliczano: pęcherzyki pierwotne otoczone pojedynczą warstwą płaskich komórek nabłonkowych mogącą zawierać kilka komórek kuboidalnych, pęcherzyki pierwszorzędowe otoczone pojedynczą warstwą komórek kuboidalnych oraz drugorzędowe z dwoma kompletnymi lub niekompletnymi warstwami komórek kuboidalnych (3, 7, 21).

Zrezygnowano ze stosowanego przez niektórych autorów (7) podziału pęcherzyków pierwotnych na pęcherzyki pozostające w spoczynku oraz pęcherzyki pierwotne aktywne, ze względu na to, że podział ten odzwierciedla raczej różnice fizjologiczne niż morfologiczne.

### Wyniki i omówienie

Jajniki klaczy ze względu na stosunkowo duże wymiary okazały się dosyć trudne do sporządzenia jednolicie cienkich skrawków histologicznych z całego przekroju. Dzięki wykorzystaniu dużego mikrotomu uzyskano skrawki, na których po odpowiednim wybarwieniu były widoczne pęcherzyki przedjamiste. Ogółem odszukano i oceniono położenie 821 pęcherzyków przedjamistych, w tym 567 rozpoznanych na preparatach z przekrojów poprzecznych oraz 256 z przekrojów podłużnych. Pęcherzyki przedjamiste znajdowano w obrębie całej warstwy mięszonej jajnika (ryc. 1). Na pojedynczym preparacie histologicznym z przekroju poprzecznego odnajdowano średnio 70,5, a na przekroju podłużnym 84,7 pęcherzyków przedjamistych. W większości pęcherzyki rozmieszczone były pojedynczo (54,7%) lub w grupach o liczebności 2 do 7 pęcherzyków (45,3%). Jako grupę traktowano pęcherzyki znajdujące się w odległości mniejszej lub równej średnicy pęcherzyka. Najczęściej występowały grupy składające się z 2 pęcherzyków: 86 grup

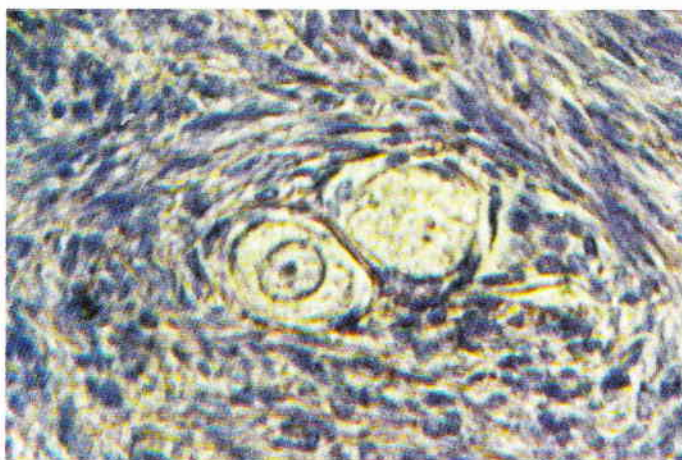


Ryc. 1. Schemat przekroju poprzecznego (A) i podłużnego jajnika klaczy (B): j – pęcherzyk jamisty, p – pęcherzyk przedjamisty, wk – warstwa korowa, wn – warstwa naczyńniowa, kj – kreszka jajnikowa

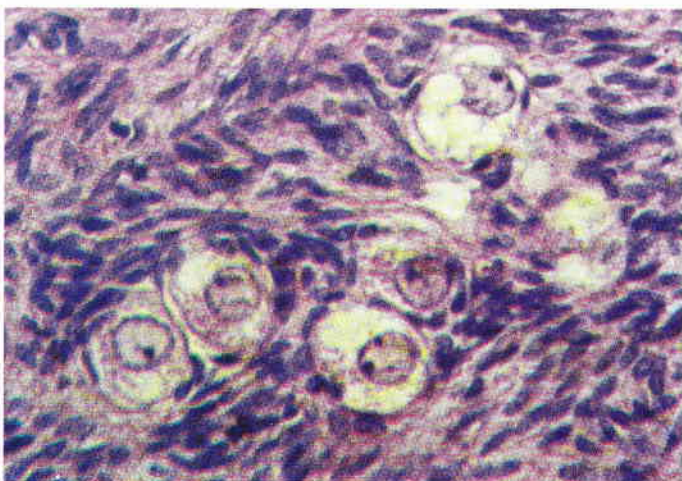
(ryc. 2) zawierających 178 pęcherzyków, co stanowiło 21,7% ogólnej liczby pęcherzyków. W jednym przypadku stwierdzono obecność 7 pęcherzyków znajdujących się obok siebie (ryc. 3; tab. 1).

Za wskaźniki atrezji pęcherzyka uznawano: rozpad jądra oocytu, nieprawidłowy wygląd nukleoplazmy, obecność dużych wakuol w obrębie ooplazmy, rozpad oocytu, marszczenie się i rozpad osłonki przejrzystej, degenerację komórek ziarnistych otaczających oocyt, obecność jąder pyknotycznych w tych komórkach, skrócenie i pogrubienie samych komórek oraz brak włosowatych naczyń krwionośnych w najbliższym otoczeniu pęcherzyka (1, 12, 18).

Za atretyczne uznawano pęcherzyki wykazujące co najmniej dwie z wyżej wymienionych cech. Z ogólnej liczby ocenianych pęcherzyków przedjamistych określono jako prawidłowe 68,82% i jako atretyczne 31,18%. Najniższy procent pęcherzyków atretycznych stwierdzono w grupie pęcherzyków pierwotnych, tj. 30,6%, najwyższy w grupie pęcherzyków II-rzędowych



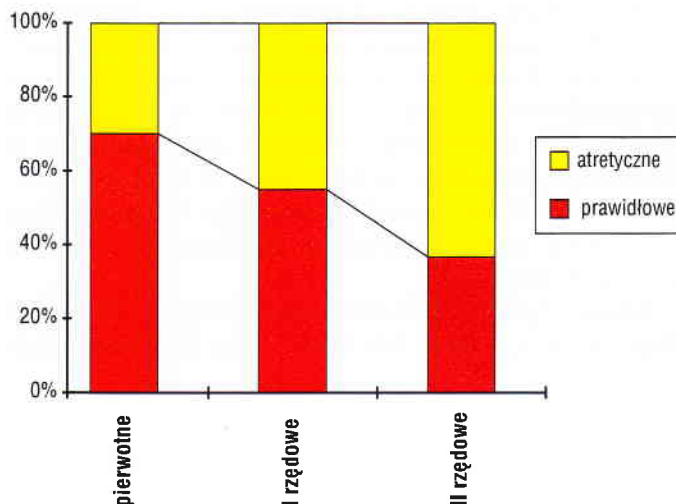
Ryc. 2. Grupa składająca się z 2 pęcherzyków pierwotnych położonych obok siebie, w jednym z nich wyraźnie widoczne jądro oocytu, powiększenie mikroskopu 400×



Ryc. 3. Grupa składająca się z 7 pęcherzyków pierwotnych, powiększenie mikroskopu 400×

63,6%. Udział pęcherzyków atretycznych wykazywał tendencję wzrostową wraz z zaawansowaniem stadium rozwojowego pęcherzyków.

W dostępnej literaturze liczebność pęcherzyków pierwotnych w jajniku kłaczy została określona na mniej niż 100, co w porównaniu z innymi gatunkami wydaje się wynikiem bardzo niskim (4). W niniejszej pracy stwierdzono obecność podobnej liczby pęcherzyków (55-98) na pojedynczych preparatach z przekrojów całego jajnika kłaczy. Nie jest to oczywiście całkowita liczba pęcherzyków przedjamistych znajdujących się w skrawku jajnika tej grubości. Pęcherzyków, które były widoczne jedynie w zarysie lub fragmentarycznie nie oceniano i nie uwzględniono w wyliczeniach. Tak więc całkowita liczba pęcherzyków przedjamistych obecnych w jajniku kłaczy wielokrotnie przewyższa liczbę pęcherzyków poddanych anali-



Ryc. 4. Procentowy udział pęcherzyków atretycznych w zależności od stopnia zaawansowania rozwoju

Tab. 1. Liczebność grup pęcherzyków

| Grupy      | Liczba grup | Liczebność | Udział procentowy |
|------------|-------------|------------|-------------------|
| Pojedyncze | 449         | 449        | 54,69             |
| Dwójki     | 89          | 178        | 21,68             |
| Trójki     | 29          | 87         | 10,60             |
| Czwórki    | 12          | 48         | 5,85              |
| Piątki     | 8           | 40         | 4,87              |
| Szóstki    | 2           | 12         | 1,46              |
| Siódemki   | 1           | 7          | 0,85              |

zie w niniejszej pracy i może wynosić kilkanaście tysięcy.

Do badań użyto jajników klaczy będącej w fazie *anestrus* ponieważ mają one wówczas najmniejsze rozmiary (średnio 65 g; długość 6 cm; grubość 4 cm (15)) i brak w nich dużych pęcherzyków jamistych > 10 mm oraz ciałek żółtych, które utrudniają sporządzenie preparatów histologicznych. Natomiast średnia liczba pęcherzyków przedjamistych w jajnikach niezależnie od fazy pozostaje taka sama (4).

U innych samic, w tym również u człowieka, pęcherzyki pierwotne, pierwszo i drugorzędowe położone są bezpośrednio pod otaczającą jajnik błoną białawą (*tunica albuginea*), do głębokości 1 mm pod powierzchnią jajnika (13). Natomiast bardziej zaawansowane stadia rozwojowe pęcherzyków znajdują się w głębszych warstwach części korowej jajnika (21). Pęcherzyk u tych gatunków rosnąc uwypukla się w postaci guzka na powierzchni jajnika, a owulacja może następować w każdym miejscu na jajniku.

W przypadku klaczy nie stwierdzono tak wyraźnych prawidłowości w rozmieszczeniu pęcherzyków przedjamistych. Pęcherzyki rozmieszczone były w sposób przypadkowy w obrębie całej warstwy mięszonej jajnika. Nie stwierdzono również prawidłowości w rozmieszczeniu grup pęcherzyków. W dostępnym piśmiennictwie nie natrafiono na opis występowania podobnych grup pęcherzyków jajnikowych u innych gatunków zwierząt.

Istotnym problemem pozostaje obecnie izolacja pęcherzyków z jajnika, ich ewentualna hodowla i doj-

rzewanie oocytów *in vitro*. Przeprowadzone badania własne wskazują, że do tego celu można wykorzystać skrawki pobrane z każdej części warstwy mięszonej jajnika.

## Piśmiennictwo

1. Bielańska-Osuchowska Z.: Embriologia. PWRiL, Warszawa 1993.
2. Boland N. J., Humpherson P. G., Lesse H. J., Gosden R. G.: Biol. Reprod. 48, 798, 1993.
3. Braw-Tal R., Yossefi S.: J. Reprod. Fert., 95, 166, 1997.
4. Driancourt M. A.: Ann. Biol. anim. Bioch. Biophys. 19, 1443, 1979.
5. Eppig J. J., O'Brien M. J.: Biol. Reprod. 54, 197, 1996.
6. Eppig J. J., Schoeder A. C.: Biol. Reprod. 41, 268, 1989.
7. Fair T., Hulshof S. C. J., Boland M., Hyttel P.: Theriogenology 45, 298, 1996.
8. Figueredo J. R., Hulshof S. C. J., Thiry M., Van den Hurk R., Bevers M. M., Nussgens B., Beckers J. F.: Theriogenology 43, 845, 1995.
9. Figureido J. R., Hulshof S. C. J., Van den Hurk R., Nussgens B., Bevers M. M., Ectorsand F. J., Beckers J. F.: Theriogenology 41, 1333, 1994.
10. Gong J. G., Campbell B. K., Bramley T. A., Peters A. R., Webb R.: J. Reprod. Fert., Abstract series 15, 7, 1995.
11. Kątska L.: Medycyna Wet. 53, 387, 1997.
12. Marion G. B., Gier H. B., Chouldry J. B.: J. Anim. Sci. 27, 451, 1968.
13. Miyamura M., Kuwayama M., Hamawaki A., Eguchil Y.: Theriogenology 45, 298, 1996.
14. Nuttick F., Mermillod P., Massip A., Dessy F.: Theriogenology 39, 811, 1993.
15. Okólski A.: Sezonowa czynność jajników i zatrzymywanie niezapłodnionych komórek jajowych w jajowodach klaczy. Praca hab. nr 48, AR Kraków 1981.
16. Ralph J. H., Wilmuth J., Telfer E. E.: J. Reprod. Fert., Abstracts series 15, 6, 1995.
17. Roy S. K., Treacy B. J.: Fertil. Steril. 59, 4, 1993.
18. Stevens A., Lowe J. S.: Histologia. Wyd. Medyczne Słotwiński Verlag, Brema 1994.
19. Telfer E. E.: Theriogenology 45, 101, 1996.
20. Torrance C., Telfer E., Gosden R. G.: J. Reprod. Fert. 87, 367, 1989.
21. Van Wezel I. L., Rodgers R. J.: Biol. Reprod. 55, 1003, 1996.
22. Wandij S. A., Eppig J. J., Fortune J. E.: Theriogenology 45, 817, 1996.

Adres autora: mgr inż. Małgorzata Szlachta, os. Słoneczne 13/41, 31-957 Kraków

**SARGEANT J. M., SCOTT H. M., LESLIE K. E., IRELAND M. J., BASHIRI A.: Kliniczna postać zapalenia gruczołu mlekowego u krów mlecznych w Ontario: częstotliwość występowania i etiologia bakteryjna. (Clinical mastitis in dairy cattle in Ontario: frequency of occurrence and bacteriological isolates). Can. Vet. J. 39, 33-38, 1998 (1)**

Występowanie klinicznej postaci zapalenia gruczołu mlekowego oraz badania bakteriologiczne mleka pochodzącego z chorych ćwiartek wymienia prowadzone przez okres 2 lat w 65 fermach bydła mlecznego w Ontario. Ogółem badaniom poddano 2840 krów i jałówek. Zmiany w mleku występowały u 9,8% krów, zmiany w mleku łącznie ze stwardnieniem lub obrzękiem wymienia występowały u 8,2% krów, zaś zmiany w mleku łącznie z klinicznymi objawami zapalenia gruczołu mlekowego występowały u 4,4% zwierząt. U 19,8% krów w okresie laktacji wystąpiło raz lub częściej zapalenie wymienia. Bakteriologicznie przebadano mleko 834 krów z kliniczną postacią zapalenia gruczołu mlekowego. W 6,7% przypadków wyosobniono *Staphylococcus aureus*, 0,7% *Streptococcus agalactiae*, 14,1% inne gatunki paciorkowców, 17,2% drobnoustroje z rodzaju okrężnicy, 5,5% gram dodatnie laseczki, 1,7% *Corynebacterium bovis* i 28,7% *Staphylococcus sp.* U krów w prowincji Ontario na 5 laktacji przypada jeden epizod klinicznego zapalenia gruczołu mlekowego. Większość przypadków dotyczy wczesnego okresu laktacji.

**ELLIS J. A., YOUNG C.: Układowe działanie niepożądane u młodych cieląt rasy simentaler po szczepieniu szczepionką kombinowaną. (Systemic adverse reactions in young Simental calves following administration of a combined vaccine). Can. vet. J. 38, 45-47, 1997 (1)**

Corocznie stosuje się u bydła miliony dawek szczepionek kombinowanych, zawierających antygeny wirusowe i bakteryjne. W związku z doniesieniami o występowaniu odczynów poszczepiennych 21 cielętom rasy simentaler w wieku 7-30 dni podano rano domięśniowo szczepionkę kombinowaną (Virabas 4+HS) zawierającą inaktywowany wirus BVDV-PI3, wirus BRSV oraz bakteryjną *Haemophilus somnus* i adjuwant. Odczyny negatywne nie wystąpiły w czasie przeprowadzania szczepienia i bezpośrednio po nich. Po 8-10 godzinach po szczepieniu jedno ciele padło u pozostałych wystąpiła depresja, utrata łaknienia, gorączka (40°C lub wyżej), gorący obrzęk w miejscu iniekcji. Po około 12 godzinach po szczepieniu cielętom podano w iniekcji penicylinę o przedłużonym działaniu (33 tys. jm) oraz deksametazon. Następnego dnia temperatura i objawy ogólne ustąpiły. Objawy kliniczne i zmiany sekcyjne stwierdzone u padłego cielęcia odpowiadają odczynowi alergicznemu typu 1 bądź uszkadzającemu wpływowi cytokin pojawiających się w efekcie działania endotoksyny. Komponenty *H. somnus* zawarte w szczepionce mogły współdziałać z adjuwantem w wywołaniu poszczepiennych objawów ubocznych.