

Twardość osłonki przejrzystej oocytów klaczy w warunkach hodowli *in vitro*

WIESŁAWA MŁODAWSKA, ADAM OKÓLSKI, IZABELA POLAK

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

Młodawska W., Okólski A., Polak I.

Hardening of equine zona pellucida in culture conditions

Summary

The aim of the study was to determine whether exposure of equine oocytes to culture conditions would affect zona pellucida hardening.

Ovaries and oviducts were collected after mare slaughter. Oocytes were recovered by aspiration of follicular fluid or by severing isolated ovarian follicles. In Exp.I ZP digestion was evaluated immediately after oocyte collection ($n = 39$) or after 30-32 hrs of culture in TCM199 + 20% FCS ($n = 19$). In Exp.II ZP digestion was evaluated before culture ($n = 29$), following incubation *in vitro* in PBS + 20% FCS for 4hrs ($n = 18$) or 6hrs ($n = 19$) as well as after incubation *in vitro* for 4hrs (30) or 6hrs (47) in isolated mares' oviducts, which were ligated at both ends. The ZPH assessment involved the incubation of individual oocytes in 50 μ l of Ringer-Krebs solution containing 0.1% pronase. ZP was considered digested when it disappeared.

That average digestion time (mean \pm SEM) of ZP was 212 ± 9 and 194 ± 4 s for oocytes directly after collection and following 30-32 hrs of incubation in TCM + 20% FCS, respectively. When comparing the digestion time of ZP between the oocytes originating from different sized follicles or different cumulus morphology no differences were found before as well as after culture. The longest digestion time of ZP was in oocytes incubated for 6 hrs in mare oviducts. This was 392 ± 9 s, which was significantly longer ($p < 0.01$) than in all other groups of oocytes.

Keywords: mare, oocyte, zona pellucida, hardening.

Badania nad zapłodnieniem *in vitro* u koni nie doprowadziły dotąd do opracowania skutecznych i powtarzalnych metod produkcji zarodków. Uzyskano tylko dwa źrebięta po zapłodnieniu oocytów pozyskanych z dojrzałych do owulacji pęcherzyków jajnikowych (1, 15) oraz trzy na drodze tzw. zapłodnienia wspomaganego, czyli mikroiniekcji plemnika poprzez osłonkę przejrzystą do cytoplazmy oocytu (19). Badania te sugerują zatem, że najtrudniejszym etapem zapłodnienia *in vitro* oocytów klaczy jest prawdopodobnie penetracja osłonki przejrzystej przez plemnik. Nie wiadomo jednak, czy barierę stanowi osłonka przejrzysta, czy plemnik jest niewłaściwie przygotowany do penetracji.

Zjawisko twardnienia osłonki przejrzystej wyrażane wzrostem jej oporności na trawienie enzymatyczne zachodzi po zapłodnieniu, sztucznej aktywacji, a także w czasie starzenia się komórki jajowej *in vitro* lub *in vivo* (4, 7, 10, 16). Zjawisko to, najlepiej poznane u myszy, związane jest z egzocytozą ziaren korowych, których enzymy modyfikują glikoproteiny osłonki przejrzystej, między innymi ZP2 (drugorzędowy receptor dla plemników). Przyjmuje się, że uwolniona z ziaren korowych proteinaza ZP2 katalizuje częściową proteolizę ZP2. Produktem proteolizy jest glikopeptyd, który nie oddziela się od ZP2, lecz pozostaje z nią związany. Zmodyfikowaną formę ZP2 nazwano ZP2_f (3, 14). Przemiany te powodują utratę przez ZP2 wła-

ściwości receptorowych dla plemników i uniemożliwiają dalszą penetrację nawet tym, które już częściowo wniknęły w osłonkę przejrzystą. Prawdopodobnie są również skorelowane z twardnieniem osłonki przejrzystej (3, 14, 17). Według Schmell i Gulyas (16), za twardnienie osłonki odpowiedzialna jest owoperoksydaza, która katalizuje sieciowanie tyrozyny pomiędzy proteinami osłonki przejrzystej. Konsekwencją twardnienia osłonki jest znaczne obniżenie zdolności oocytów do zapłodnienia i dalszego rozwoju zarodkowego (mysz: 8, 10; bydło: 11). Wydawało się zatem celowe przeprowadzenie badań nad oceną twardości osłonki przejrzystej oocytów klaczy poddanych inkubacji w warunkach *in vitro*.

Materiał i metody

Badania wykonano w okresie od lutego do września 1997 r. na oocytach pozyskanych z jajników po uboju 45 klaczy, których wiek i kariera rozrodcza nie były znane.

Jajniki pobierano wraz z jajowodami i transportowano w termosie (20-25°C) do laboratorium. Jajowody odcinano, izolowano ze zbędnej tkanki i podwiązywano z obu stron. Następnie jajowody i jajniki przepłukiwano trzykrotnie w ciepłym (35-37°C) płynie PBS (Zbuforowany Roztwór Soli Fizjologicznej; Biolab) z dodatkiem antybiotyków (13). Do momentu wprowadzenia oocytów, jajowody przetrzymywano w TCM 199-Hepes z 10% dodatkiem FCS (surowica płodów cielęcych), w temperaturze 38,5°C. Oocyty pozyskiwano z pęcherzyków o średnicy ≥ 3 mm

poprzez aspirację płynu pęcherzykowego przy pomocy igły (1,8 mm) i strzykawki (10 ml) lub metodą rozcinania wyizolowanych pęcherzyków jajnikowych (13). Czas od uboju kłaczy do wyszukania oocytów wynosił od 2 do 4 godzin. Pozyskane oocyty (n=317) wykorzystano w dwóch etapach do oceny twardości osłonki przejrzystej.

W etapie I, twardość osłonki przejrzystej oceniano bezpośrednio po pozyskaniu oocytów lub po 30-32 godzinach hodowli *in vitro* w TCM 199 (Sigma) z 20% dodatkiem FCS oraz FSH (9,5 µg/ml), LH (15 µg/ml), estradiolu 17β (1 µg/ml) i PSF (penicylina 100 IU/ml, streptomycyna 100 µg/ml, fungizone 0,25 µg/ml; Gibco). Każdy oocyt hodowano oddzielnie w 0,1 ml pożywki pod warstwą oleju parafinowego, w temperaturze 38,5°C i atmosferze 5% CO₂ w powietrzu.

W etapie II, twardość osłonki oceniano przed hodowlą (T0), po 4 (T4) lub 6 (T6) godzinach inkubacji 3-5 oocytów w 0,1 ml PBS z 20% dodatkiem FCS oraz po 4 (T4j) lub 6 (T6j) godzinach inkubacji 6-13 oocytów w izolowanych jajowodach kłaczy. Podwiązane jajowody inkubowano każdy oddzielnie w 10 ml TCM 199 z 10% dodatkiem FCS, równoległe z oocytami inkubowanymi w PBS.

Ocena twardości polegała na pomiarze czasu koniecznego do rozpuszczenia osłonki przejrzystej w 0,1% roztworze pronazy w płynie Ringera-Krebsa (pH=7,4). Każdy oocyt umieszczano indywidualnie w 50 µl roztworu i obserwowano proces trawienia osłonki przejrzystej. Przed trawieniem mechanicznie usuwano z powierzchni osłonki komórki wzgórka jajonośnego i wieńca promienistego.

Do analizy statystycznej uzyskanych wyników wykorzystano jednoczynnikową analizę wariancji oraz test Scheffego. Porównanie istotności różnic przeprowadzono dla grup o liczebności większej niż 5 oocytów.

Wyniki i omówienie

Ocenę twardości osłonki przejrzystej każdego oocytu przeprowadzono z uwzględnieniem morfologii wzgórka jajonośnego i wielkości pęcherzyka jajnikowego, z którego został pozyskany. Średni czas trawienia osłonek oocytów pobranych z pęcherzyków o średnicy ≤ 10, 11-15, 16-20, 21-30 i ≥ 30 mm był zbliżony zarówno przed hodowlą (181 ± 13-246 ± 29 s) jak i po 30-32 godzinach hodowli *in vitro* (172 ± 8-219 ± 32 s; tab. 1). Badania wykonane na oocytach mysich i bydłych wykazały, że do ztwardnienia osłonki nie dochodzi w czasie dojrzewania oocytu *in vivo*, wewnątrz pęcherzyka jajnikowego (11, 18). Zdaniem Siracusa i wsp. (18) w pęcherzyku przedowulacyjnym myszy dochodzi do zjawiska przeciwnego niż ztwardnienie. Osłonka przejrzysta oocytów w stadium pęcherzyka zarodkowego jest gorzej rozpuszczalna, niż osłonka komórek jajowych pozyskanych bezpośrednio po owulacji (18). U bydła natomiast, komórki jajowe charakteryzują się znacznie twardszą osłonką niż oocyty niedojrzałe i przedowulacyjne (11). U kłaczy, badania nad oceną twardości osłonki przejrzystej oocytów przedowulacyjnych i komórek jajowych wymagają kontynuacji.

Przeprowadzone badania nie wykazały wpływu morfologii wzgórka jajonośnego na twardość osłonki przejrzystej. Niezależnie od wyglądu wzgórka, średni czas trawienia osłonek był zbliżony przed hodowlą (183 ± 16-213 ± 21) i po hodowli *in vitro* (178 ± 18-207 s;

Tab. 1. Wpływ wielkości pęcherzyka jajnikowego i czasu hodowli na twardość osłonki przejrzystej oocytów kłaczy

Średnica pęcherzyka [mm]	Czas trawienia osłonki przejrzystej oocytów [s]			
	bezpośrednio po pozyskaniu		po hodowli <i>in vitro</i>	
	n	$\bar{x} \pm s$	n	$\bar{x} \pm s$
≤ 10	10	226 ± 18	3	204 ± 17
11-15	11	181 ± 13	8	172 ± 8
16-20	11	199 ± 16	6	219 ± 32
21-30	5	229 ± 21	1	173
≥ 30	2	246 ± 29		

Objaśnienie: n – liczba oocytów.

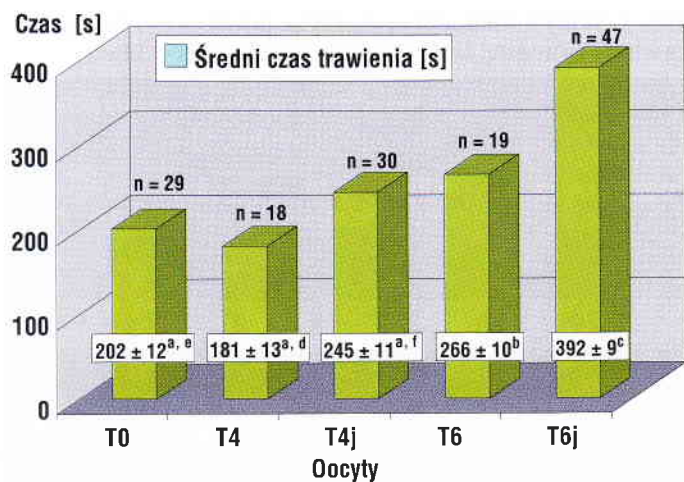
Tab. 2. Ocena twardości osłonki przejrzystej w zależności od morfologii wzgórka jajonośnego i czasu hodowli

Klasa morfologiczna oocytu	Czas trawienia osłonki przejrzystej oocytów [s]			
	bezpośrednio po pozyskaniu		po hodowli <i>in vitro</i>	
	n	$\bar{x} \pm s$	n	$\bar{x} \pm s$
Zwj	8	197 ± 26	7	186 ± 32
Wp	9	213 ± 21	5	178 ± 27
Rwj	10	183 ± 16	6	178 ± 18
Exp	12	220 ± 13	1	207
Razem	39	212 ± 9	19	194 ± 4

Objaśnienia: Zwj – oocyty otoczone zbitym wzgórkem jajonośnym; Wp – oocyty otoczone tylko zbitym wieńcem promienistym; Rwj – oocyty otoczone częściowo rozproszonym wzgórkem jajonośnym; Exp – oocyty otoczone w pełni rozproszonym wzgórkem jajonośnym; n – liczba oocytów.

tab. 2). Dell' Aquila i wsp. (5) wykazali, że całkowity brak wzgórka jajonośnego i wieńca promienistego w czasie dojrzewania *in vitro*, powoduje niewielki wzrost twardości osłonki przejrzystej oocytów kłaczy. U myszy brak wzgórka jajonośnego lub/i surowicy w czasie hodowli oocytów *in vitro* powoduje tzw. spontaniczne ztwardnienie osłonki przejrzystej (8, 18).

Zastosowane warunki hodowli (pożywka TCM 199 z 20% dodatkiem FCS) nie spowodowały ztwardnienia osłonki przejrzystej (tab. 2). Do ztwardnienia osłonki dochodzi gdy oocyty kłaczy hodowane są w obecności albuminy bydłowej lub surowicy kłaczy w rui, natomiast dodatek fetuiny, płynu pęcherzykowego, surowicy płodów końskich lub cielęcych hamuje ten proces (5, 6). Również u myszy, obecność wzgórka jajonośnego, płynu pęcherzykowego, surowicy lub fetuiny hamuje ztwardnienie osłonki w warunkach *in vitro* (8, 17, 18). Podobne właściwości wykazuje heparyna i siarczan chondroityny B, substancje obecne w płynie pęcherzykowym (18). Przyjmuje się, że ztwardnienie



Ryc. 1. Wpływ różnych warunków inkubacji oocytów na twardość osłonki przejrzystej

Objaśnienia: T0 – oocyty trawione bezpośrednio po pozyskaniu; T4 – oocyty trawione po 4 godzinnej inkubacji w PBS; T4j – oocyty trawione po 4 godzinnej inkubacji *in vitro* w izolowanych jajowodach kłaczy; T6 – oocyty trawione po 6 godzinnej inkubacji w PBS; T6j – oocyty trawione po 6 godzinnej inkubacji *in vitro* w izolowanych jajowodach kłaczy; a,c; b,c; b,d – $p \leq 0,01$; b,e; d,f – $p \leq 0,05$.

osłonki przejrzystej związane jest z egzocytozą ziaren korowych i przemianą glikoproteiny ZP2 w ZP2_r (9, 14, 17). U myszy, do powolnego i ograniczonego uwalniania ziaren korowych dochodzi również w trakcie dojrzewania oocytów *in vivo*. Nie powoduje to jednak modyfikacji ZP2 (9). Badania te sugerują zatem, że wewnątrz pęcherzyka jajnikowego, a ściślej w płynie pęcherzykowym znajdują się substancje hamujące przedwczesne twardnienie osłonki, prawdopodobnie obecne również w płynie pęcherzykowym kłaczy.

Na ryc. 1 przedstawiono wpływ czasu inkubacji oocytów w izolowanych jajowodach kłaczy na twardość osłonki przejrzystej. Najbardziej oporna na trawienie była osłonka oocytów inkubowanych w jajowodach przez 6 godzin (T6j). Średni czas trawienia wynosił 392 ± 9 s i był niemal dwukrotnie dłuższy, niż w grupie trawionej przed inkubacją (202 ± 12 s; $p < 0,01$). Czterogodzinna inkubacja w jajowodach nie spowodowała istotnego wydłużenia czasu trawienia osłonki przejrzystej. U bydła, do twardnienia osłonki dochodzi po kilku minutach inkubacji przy bezpośrednim kontakcie osłonki ze środowiskiem jajowodowym i dotyczy tylko tzw. nagich oocytów, tj. pozbawionych komórek wzgórkajajonośnego i wieńca promienistego. Ponadto, wpływa negatywnie na zapłodnialność oocytów (11). Być może usunięcie komórek pęcherzykowych z oocytów kłaczy przyspieszyłoby proces twardnienia osłonki. Jednak *in vivo*, nawet 12 godzin po owulacji, zapłodniona komórka jajowa kłaczy otoczona jest kilkoma warstwami komórek wzgórkajajonośnego (2).

Wzrost oporności osłonek na trawienie obserwowano również po 6 godzinach inkubacji oocytów w płynie PBS (T6), jednak nie tak silny jak w środowisku jajowodowym (ryc. 1). Prawdopodobnie zawarte w płynie jajowodowym substancje modyfikują właści-

wości osłonki przejrzystej. Obecność płynu jajowodowego w czasie dojrzewania *in vitro* oocytów świni warunkuje prawidłowy przebieg reakcji korowej, zmniejszając odsetek oocytów zapłodnionych polispermicznie i równocześnie indukuje twardnienie osłonki przejrzystej (12). U myszy, spontaniczna utrata ziaren korowych i twardnienie osłonki *in vivo* rozpoczyna się po określonym czasie od owulacji i postępuje wraz ze starzeniem się oocytów. Prowadzi w konsekwencji do utraty zdolności do zapłodnienia (7). Potwierdzają to obserwacje wykonane za pomocą mikroskopu elektronowego na oocytach poddanych starzeniu się *in vitro* (7). Twardnienie osłonki obserwowane po 6 godzinach inkubacji w PBS, prawdopodobnie spowodowane było procesem starzenia się oocytów, gdyż płyn ten stanowił zbyt ubogie środowisko by oocyty mogły podjąć dojrzewanie. Na podstawie wykonanych badań i wybranych pozycji piśmiennictwa można sugerować, że zarówno niewłaściwe warunki hodowli jak i zbyt późna próba zapłodnienia *in vitro*, w momencie gdy rozpoczęła się już egzocytoza ziaren korowych i twardnienie osłonki przejrzystej, mogą w znacznym stopniu przyczynić się do jego niepowodzenia.

Przeprowadzone badania wykazały, że hodowla oocytów kłaczy w pożywce TCM 199 uzupełnionej 20% dodatkiem surowicy płodów ciążących nie powoduje twardnienia osłonki przejrzystej. Morfologia wzgórkajajonośnego i wielkość pęcherzyka jajnikowego, z którego pozyskano oocyt, również nie wywierają wpływu na twardość osłonki przejrzystej. Natomiast sześciogodzinna inkubacja oocytów w środowisku jajowodowym, powoduje istotny wzrost oporności osłonki przejrzystej na trawienie pronazą.

Piśmiennictwo

1. Bezar J.: Międz. Konf. Nauk.: Biotechniki w rozrodzie koni, Kraków, 1992, s. 25.
2. Bezar J., Magistrini M., Duchamp G., Palmer E.: Equine vet. J., Suppl. 8, 105, 1989.
3. Bleil J. D., Beall C. F., Wassarman P. M.: Dev. Biol. 86, 189, 1981.
4. Chang M. C., Hunt D. M.: Exp. Cell Res. 11, 497, 1956.
5. Dell'Aquila M. E., De Felici M., Maritato F., Lacalandra G., Minoia P.: Proc. 14 Symp. A.E.T.E., Venice, 1998, s. 140.
6. Dell'Aquila M. E., De Felici M., Massari S., Maritato F., Minoia P.: Proc. Symp. „Gametes: Development and Function” Milano, 1998, s. 522.
7. Dodson M. G., Minhas B. S., Curtis S. K., Palmer T. V., Robertson J. L.: J. In Vitro, 6, 101, 1996.
8. Down S. M., Schroeder A. C., Eppig J. J.: Gamete Res. 15, 115, 1986.
9. Ducibella T., Kurasawa S., Rangarajan S., Kopf G. S., Schultz R. M.: Dev. Biol. 137, 46, 1990.
10. Gianfortoni G. J., Gulyas B. J.: Gamete Res. 11, 59, 1985.
11. Kątska L.: Zapłodnienie *in vitro* dojrziałych *in vivo* i *in vitro* oocytów bydłowych. Praca hab. IZ, Kraków, 1991.
12. Kim N. H., Funahashi H., Abeysdeera L. R., Moon S. J., Prather R. S.: J. Reprod. Fert. 107, 79, 1996.
13. Młodawska W., Okólski A.: Equine vet. J., Suppl. 25, 38, 1997.
14. Moller C. C., Wassarman P. M.: Dev. Biol. 132, 103, 1989.
15. Palmer E., Bezar J., Magistrini M., Duchamp G. J.: Reprod. Fert., Suppl. 44, 375, 1991.
16. Schmell E. D., Culyas B. J.: Gamete Res. 3, 279, 1980.
17. Schroeder A. C., Schultz M. R., Kopf G. S., Taylor F. R., Becker R. B., Eppig J. J.: Biol. Reprod. 43, 891, 1990.
18. Siracusa G., De Felici M., Salustri A., Dolci S.: Proc. Symp. In Vitro Approaches to Mammalian Gamete Maturation and Embryonic Development, Milano, Sero-vet-Roma, 1989, s. 11.
19. Squires E. L., McCue P. M., Vanderwall D.: Theriogenology 51, 91, 1999.