

ADAM OKÓLSKI, JOSEF FULKA JR

Wstępne badania nad hodowlą oocytów klaczy *in vitro**

Z Instytutu Sterowanej Fizjologii Zwierząt AR w Krakowie
Z Instytutu Badań nad Produkcją Zwierząt Czechosłowackiej Akademii Nauk w Pradze

Pincus i Enzmann (9) pierwsi stwierdzili, że oocyty pobrane od królików rozwijają się osiagając stadium mejozy w czasie hodowli poza pęcherzykami. Od tego czasu prowadzono hodowle oocytów *in vitro* pobranych od różnych gatunków zwierząt laboratoryjnych i gospodarskich. Obszerny przegląd piśmiennictwa na ten temat podaje Thibault (11). Brak jest jednak danych dotyczących hodowli oocytów pozyskiwanych z jajników (3).

Celem pracy była próba hodowli *in vitro* oocytów klaczy i określenie zmian zachodzących w czasie podziałów.

Materiał i metody

Oocyty pobierano przy pomocy strzykawki, z pęcherzyków o średnicy 5–30 mm, z wyciętych jajników, bezpośrednio po uboju klaczy. W czasie transportu do laboratorium pozyskany płyn pęcherzykowy z oocytami przechowywano w temperaturze 30°C. Oocyty identyfikowano przy pomocy mikroskopu stereoskopowego i do dalszych badań wybierano takie, które posiadały nieuszkodzony wzgórek jajonośny. Jednorazowo do badań pobierano oocyty od 8–12 klaczy. Do hodowli *in vitro* użyto łącznie 80 oocytów. Hodowlę prowadzono w 0,1 ml medium, pod olejem parafinowym, przy 5% dodatku CO₂ do powietrza, w temperaturze 37,5°C. Jako medium stosowano pożywkę opisaną przez Pavloka i Mc Larena (8) w modyfikacji podanej przez Motlika i Fulkę (6). Hodowlę prowadzono w dwóch wariantach czasowych 20–24 godz. i 40 godz. Dla określenia stanu oocytów przed rozpoczęciem hodowli kontrolnie zbadano 33 oocyty. Po oddzieleniu komórek wzgórka jajonośnego oocyty osadzano na szkiełku podstawowym, utrwalano w kwasie octowym z alkoholem (1:3), barwiono orceiną i badano pod mikroskopem fazowo-kontrastowym.

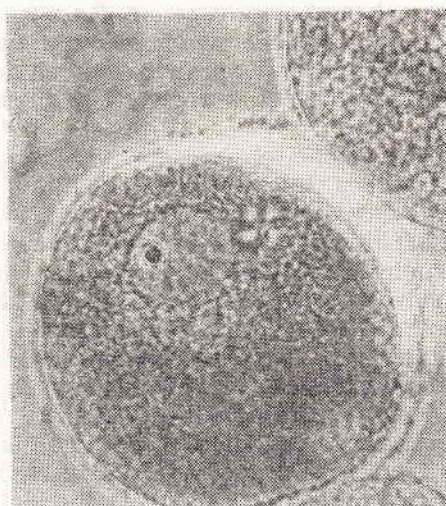
Wyniki i omówienie

Średnia ilość oocytów pozyskiwanych od jednej klaczy wynosiła od 3–5. Jak przedstawiono w tab. 1. większość kontrolnych oocytów (69,6%) znajdowała się w stadium pęcherzyka zarodkowego. Stadium to charakteryzuje się wyrazistością jądra, granulacją neukleo-

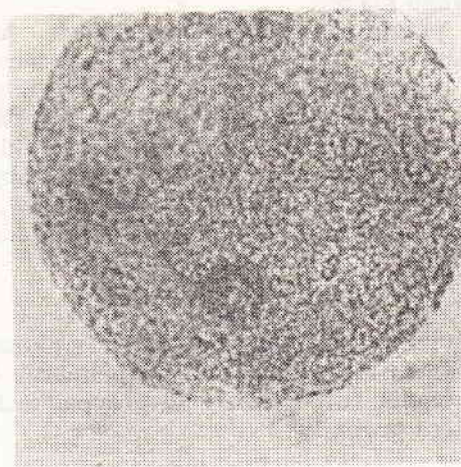
plazmy i wyraźną widocznością błony jądrowej. Intensywnie zabarwiona chromatyna widoczna jest na peryferiach jądra lub rozrzucona w nukleoplazmie (ryc. 1). Wśród pozostałych kontrolnych oocytów u 5 stwierdzono stadium metafazy I, a 5 było zdegenerowanych.

Po okresie hodowli od 20 do 24 godzin oceniono 17 oocytów — 12 (70,6%) z nich osiągnęło stadium metafazy I (ryc. 2), 2 stadium metafazy II, 3 były zdegenerowane.

Sześćdziesiąt trzy oocyty inkubowano przez okres 40 godzin. U 43 (68,2%) stwierdzono wyraźną metafazę II z widocznym I ciąkiem kierunkowym (ryc. 3), u 4 stwierdzono metafazę I, a 16 było zdegenerowanych.



Ryc. 1. Wyizolowany z pęcherzyka oocyt przed rozpoczęciem hodowli. Stadium pęcherzyka zarodkowego. Fazo-kontrast. Pow. 1100X



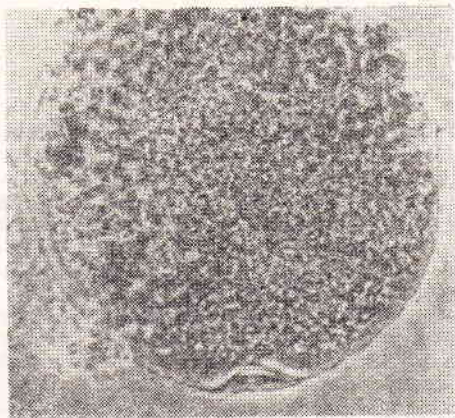
Ryc. 2. po 24 godzinach hodowli. Stadium I metafazy

Tab. 1. Wyniki hodowli *in vitro* oocytów klaczy

Okres inkubacji (godz.)	Stadium podziału				Razem
	Pęcherzyk zarodkowy	Metafaza I	Metafaza II	Zdegenerowane	
0	23 (69,6%)	5	0	5	33
20–24	0	12 (70,5%)	2	3	17
40	0	4	43 (68,2%)	16	63

* Praca wykonana w ramach problemu MR II.10. koordynowanego przez AR Wrocław.

Przedstawione wyniki wskazują, że oocyty klaczy, w porównaniu z oocytami innych gatunków zwierząt, wymagają stosunkowo długiego okresu czasu dla uzyskania stadium II metafazy w hodowli *in vitro*. Zmiany w jądrach oocytów, w zbliżonym do klaczy okre-



Ryc. 3. Oocyt po 40 godzinach hodowli. Formowanie I ciała kierunkowego

się, odbywają się w czasie hodowli *in vitro* oocytów świń (5), owiec (10) i ludzi (2). Uzyskanie dokładniejszych i szczegółowych danych wymaga przeprowadzenia badań na znacznie większej liczbie oocytów. U klaczy możliwością ta jest ograniczona stosunkowo niewielką ilością widocznych na przekrojach jajnikowych pęcherzyków, z których udaje się pozyskać oocyty. Ma to miejsce szczególnie w okresie jesienno-zimowym, kiedy aktywność jajników klaczy jest wyraźnie obniżona (7). Podobne obserwacje przedstawił Driancourt (1) w badaniach dotyczących dynamiki wzrostu pęcherzyków klaczy, stwierdzając znacznie mniejszą ich ilość u klaczy w porównaniu z innymi gatunkami zwierząt. Wydaje się, że jest to główna przyczyna pozyskiwania niewielkiej ilości oocytów od jednej klaczy w badaniach własnych.

Według danych tab. 1. stwierdzono stosunkowo duży procent degeneracji badanych oocytów na różnym etapie rozwoju. Oocyty te prawdopodobnie pochodziły z pęcherzyków atretycznych, mimo uprzedniej selekcji wszystkich oocytów z uszkodzonym wzgórkami jajonośnym. Podobną opinię prezentują McGaughey i wsp. (4), którzy wykazali, że oocyty pochodzące z pęcherzyków w różnym stadium atrezji rozpoczynają podziały mejozytyczne, lecz ich nie kończą.

Przedstawione badania wykazały przede wszystkim, że istnieje możliwość hodowli *in vitro* oocytów klaczy izolowanych z pęcherzyków jajnikowych.

Piśmiennictwo

1. Driancourt M. A.: Ann. Biol. anim. Bioch. Biophys. 19, 1443, 1979.

2. Jagiello G., Ducayen M., Miller W., Graffeo J., Fang J. S.: J. Reprod. Fert. 43, 9, 1975.
3. Fulka J., Okólski A.: J. Reprod. Fert. 1980 w druku.
4. McGaughey R. W., Montgomery D. H., Richter J. D.: J. Exp. Zool. 209, 239, 1979.
5. Motlik J.: Pol. Biol. (Prague) 18, 345, 1972.
6. Motlik J., Fulka J.: J. Reprod. Fert. 36, 235, 1974.
7. Okólski A., Bielanski A.: Proc. 9th Int. Congr. Anim. Reprod. Art. Insem. Madrid 1980.
8. Pavlok A., McLaren A.: J. Reprod. Fert. 29, 91, 1972.
9. Pincus G., Enzmann E. V.: J. Exp. Med. 62, 665, 1935.
10. Qurike J. F., Gordon I.: J. agric. Sci. Camb. 76, 369, 1971.
11. Thibault C.: J. Reprod. Fert. 51, 1, 1977.

Adres autora: dr Adam Okólski, ul. Koniewa 61/13, 30-153 Kraków.

Окульский А., Фулька Ю. — Предварительные исследования культуры ооцитов кобылы.

Ооциты выволаскивали после забоя из яичниковых пузырьков кобылы и выращивали *in vitro*. До начала выращивания стадию зародышевого пузырька наблюдали у 69,6% ооцитов. После 20—24-часового выращивания *in vitro* обнаружили стадию I метафазы у 70,5% ооцитов. Первое мейотическое деление было закончено через 40 часов инкубации. В это время 68,2% ооцитов находилось во II метафазе с заметными I направляющим тельцем.

Okólski A., Fulka J. — Preliminary investigations on the cultivation of horse oocytes *in vitro*.

Horse follicular oocytes were cultured *in vitro*. Before the beginning of culture the stadium of germinal vesicle was found in 69.6 per cent of the oocytes. After 20-24 hours of the culture *in vitro* the metaphase I was detected in 70.5 per cent of the oocytes. The first meiotic division was completed after 40 hours when 68.2 per cent of the oocytes were in the metaphase II with first polar body extruded.

PERRYMAN L. E., Mc GUIRE T. C., TORBECK R. R.: Ontogeneza czynności limfocytów u płodu źrebęcia. (Ontogeny of lymphocyte function in the equine fetus). Am. J. vet. Res. 41, 1197—1200, 1980 (8).

W badaniach przeprowadzonych na 16 płodach źrebąt w okresie 61—200 dni życia płodowego określono zdolność tkanek grasicy, wątroby, śledziony, krezkowych węzłów chłonnych i szpiku kostnego do odpowiedzi na fitolecynę i allogeniczną stymulację limfocytów. Limfocyty funkcjonalne pojawiały się u źrebąt przed urodzeniem. Limfocyty reagujące na fitolecynę i podatne na stymulację antygenową stwierdzono u 80 dniowych płodów, zaś immunoglobuliny klasy IgM i IgG występowały w krwiobiegu płodów w wieku około 200 dni.

G.

FREEMAN B. M.: Glukagon — hormon stresowy u drobiu. (Glucagon a stress hormone in the domestic fowl). Res. vet. Sci. 28, 389—390, 1980 (3).

Badania przeprowadzono na jednodniowych kurczętach w dwóch grupach doświadczalnych. Kurczętom podano do jamy ciała glukagon w dawce dziennej 50 µg/kg przez 5 kolejnych dni. Podanie glukagonu nie wpływało na szybkość wzrostu kurcząt, zwiększało natomiast względny ciężar nadnerczy i poziom cholesterolu w tym narządzie. Ciężar nadnerczy u kurcząt otrzymującym glukagon wynosił 214±8 mg/kg, kontrola 189±7 mg/kg, zawartość cholesterolu 20,1±0,7 mg/g, kontrola 17,8±0,6 mg/g. U kurcząt występowała hypoglikemia, hypercholesterolemia oraz obniżenie poziomu kortykosteronu w plazmie (3,0±0,3 ng/l, kontrola 4,4±0,5 ng/l). Uzyskane wyniki potwierdzają hipotezę, że glukagon jest hormonem stresowym który pobudza oś podwzgórze-przysadka-nadnercze.

G.