

URSZULA EYSMONT, JACEK DZIAK, MARIA CZŁONKOWSKA

Czynniki wpływające na dojrzewanie *in vitro* oocytów ssaków

Instytut Genetyki i Hodowli Zwierząt PAN w Jastrzębiu, 05-551 Mroków

W ostatniej dekadzie notuje się znaczne przyspieszenie w opracowaniu i wykorzystaniu praktycznym nowych biotechnik w produkcji zwierzęcej. Dość powszechnie stosowana jest transplantacja zarodków u zwierząt, która w wielu krajach przynosi wymierne efekty w postaci szybkiego zwiększania поголовья zwierząt o pożądaną wartość hodowlaną. Przenoszenie zarodków w połączeniu z techniką zapłodnienia *in vitro* znajduje najszerze zastosowanie w pokonywaniu jałowości szczególnie w medycynie ludzkiej, ale także u zwierząt użytkowych (4). Wartościowe samice ze zmianami patologicznymi macicy lub jajowodów wykluczającymi użytkowanie rozplodowe, za pomocą tej techniki mogą być włączone do reprodukcji (4). Ayalon (1) podaje, że u krów wykazujących nieprawidłowości w funkcjonowaniu narządów rodnych, liczbę oocytów, które pozostają niezapłodnione, ocenia się na 29—40%. Stosując zapłodnienie *in vitro* i zastępcze matki-biorkownicy można zmniejszyć straty zarodków spowodowane ich wczesną zamieralnością (5). Technika zapłodnienia *in vitro* umożliwia ocenę zdolności do zapłodnienia zarówno oocytów, jak i plemników, a także efektywne wykorzystanie nasienia cennych samców, a co za tym idzie — produkcję dużej liczby potomstwa od rodziców wartościowych pod względem hodowlanym (4, 5).

Ważnym zagadnieniem jest czas i sposób pobierania oocytów z pęcherzyków jajnikowych. W medycynie ludzkiej pozyskuje się już dojrzałe oocyty, a zapłodnienia dokonuje się *in vitro*. U zwierząt natomiast istnieją dwie drogi pozyskiwania oocytów. Jedną to wyplukiwanie lub pobieranie oocytów dojrzałych *in vivo* po hormonalnej indukcji superowulacji, a drugą to pozyskiwanie oocytów z pęcherzyków jajnikowych pobieranych z jajników ubitych krów i jałówek. Obie metody zmierzają do osiągnięcia konkretnych celów. W przypadku pobierania oocytów dojrzałych bada się *in vitro* wpływ hormonów podanych w celu wywołania superowulacji na jakość oocytów i ich zdolność do zapłodnienia. Jest to problem szczególnie ważny, ponieważ — jak dotychczas — notuje się różnicowaną reakcję na hormony stosowane do wywołania superowulacji, a jakość zarodków nie zawsze jest zadowalająca. Dlatego też możliwość badania tak wczesnych stadiów rozwoju zarodków pozwala określić moment, w którym zachodzi proces degeneracji i poszukiwać czynników powodujących niski procent zapłodnienia

oocytów (13). W przypadku pobierania oocytów niedojrzałych istnieje możliwość ustalenia warunków, w jakich zachodzi proces dojrzewania i zapłodnienia, a co za tym idzie — uzyskanie dodatkowego źródła zarodków od wartościowych pod względem genetycznym samic, skierowanych na ubój z innych powodów, aniżeli nieplodność (30).

Komórkom pobranym z pęcherzyków jajnikowych należy zapewnić *in vitro* optymalne warunki, niezbędne do osiągnięcia pełnej dojrzałości.

Podstawowym problemem jest dobór warunków hodowli odpowiednich dla oocytów różnych gatunków zwierząt. Jednym z głównych czynników wpływających na efektywność hodowli oocytów są pożywki hodowlane. Składają się one z bardzo wielu komponentów: sole mineralne, aminokwasy, związki energetyczne, witaminy i antybiotyki (37). Pomyślnie wyniki daje hodowla *in vitro* oocytów myszy w płynie TCM-199 (6, 8) lub w BMOC-2 (6), oocytów bydła w płynie Tayroda (3, 18), w MEM (14), w FCS z dodatkami (34), w KRB (15), w TCM-199 (21), w HAM-F12 (11), oocytów owiec w M-199 (25, 27, 32), w Dulbecco uzupełnionym surowicą owczą (27), oocytów świń w KRB (15), w M-199 (29) i w Menezo B₂ (12). Czas hodowli oocytów stosowany przez różnych badaczy waha się od 24 do 48 godzin (3, 5, 14) a temperatura, w której odbywa się hodowla od 37°C (6, 14, 17, 32) do 39°C (3, 18). Niezmiennie natomiast pozostają warunki gazowe hodowli. Oocyty hodowane są w obecności 5% CO₂ w powietrzu przy 95%—100% wilgotności.

Kryterium dojrzałości oocytów jest osiągnięcie w trakcie hodowli stadium metafazy II, choć nie jest to równoznaczne z pełną dojrzałością cytoplazmy oocyty, konieczną do prawidłowego przebiegu procesu zapłodnienia. Ponieważ *in vivo* na zamknięty w pęcherzyku oocyt działają gonadotropiny i estrogeny (9, 32), oczywiście jest potrzeba dodania tych hormonów do hodowli *in vitro*. Hodując oocyty bydłace w pożywce zawierającej różne kombinacje gonadotropin FSH i LH oraz sterydów osiągnięto 61,4—74,1% dojrzałych oocytów (11), natomiast synergiczne działanie LH i estradiolu dało efekt w postaci 62,6% oocytów bydłacych w stadium metafazy II. Zdaniem niektórych badaczy rola sterydów w dojrzewaniu oocytów ssaków jest kontrowersyjna. Wydaje się, że sterydy nie wpływają istotnie na dojrzewanie oocytów, jako że inhibitory sterydów nie zapobiegają podjęciu

procesu mejozy przez oocyty znajdujące się w pęcherzykach poddanych działaniu LH *in vitro* (20, 36). Inni autorzy donoszą natomiast, że sterydy odgrywają ważną rolę w końcowym etapie procesu dojrzewania zarówno jądra, jak i cytoplazmy oocytu (2, 23, 28, 33). Obecność sterydów nie jest niezbędna do procesu pęknięcia pęcherzyka zarodkowego i formowania płytki metafazalnej I, natomiast konieczna jest do dojrzewania cytoplazmy (24, 26). Niski poziom sterydów w otoczeniu dojrzewającego oocytu powoduje anomalie zapłodnienia, opóźnia podział i różnicowanie komórek (24). Obniżając poziom sterydów w hodowli przez dodanie inhibitora sekrecji estrogenów i testosteronu Moor i wsp. (26) otrzymali tylko 13% zapłodnionych oocytów owcy, dojrzewających uprzednio w pęcherzykach jajnikowych *in vitro*. Liczba zapłodnionych oocytów zwiększyła się do 50%, kiedy inhibitor dodano do pożywki na 8 godzin przed zakończeniem hodowli. Znaczenie sterydów dla dojrzewania oocytów bydłych potwierdził w swojej pracy Fukui i wsp. (9). Dodając do pożywki hodowlanej estradiol lub progesteron otrzymali odpowiednio 61,7% i 55,2% oocytów w stadium metafazy II. Oocyty hodowane bez dodatku hormonów osiągnęły metafazę II w 47,8%. W mniejszym stopniu niż estradiol na dojrzewanie oocytów bydła (9) i świń (12) wpływa progesteron. Odgrywa on natomiast decydującą rolę u innych zwierząt jak płazy i ryby (16, 22, 31).

U ssaków gonadotropiny wywołują cytologiczne i biochemiczne zmiany w pęcherzykach jajnikowych (12, 35). Następuje podwyższenie sekrecji sterydów i poziomu prostaglandyny (12). FSH powoduje dysocjację komórek kumulusa i wydzielanie przez nie substancji międzykomórkowej (matrix) złożonej z glikoaminoglikanów (m.in. kwas hialuronowy). Powoduje to przerwanie połączeń cytoplazmatycznych między oocytem a komórkami kumulusa, a co za tym idzie — przerwanie transportu do komórki jajowej cAMP i inhibitora dojrzewania oocytu OMI. Znaczne obniżenie poziomu cAMP i OMI jest prawdopodobnie sygnałem do podjęcia przez oocyt zatrzymanego podziału mejozy (35). Hodując *in vitro* oocyty świń w izolowanych pęcherzykach jajnikowych z dodatkami FSH i FSH+LH otrzymano 80% oocytów w stadium metafazy I i II (12). W świetle ostatnich badań wydaje się, że FSH działa bardziej aktywnie w pobudzaniu mejozy niż LH (9, 12).

Aktywność, jaką przejawiają hormony dodawane do hodowli zależy także, między innymi, od sposobu hodowli (9). W swoich badaniach Racowsky i wsp. (29) wykazali, że ani płyn pęcherzykowy, ani komórki ziarniste hodowane razem z oocytami świń nie wpływały hamująco na podejmowanie mejozy. Podobne rezultaty uzyskano hodując oocyty owiec z komórkami folikularnymi w obecności gonadotropin i estro-

genów w różnych stężeniach, w niestatycznym systemie hodowli (32). Zastosowanie niestatycznego systemu hodowli jest dodatkowym, istotnym elementem pozwalającym na utrzymanie prawidłowej równowagi sterydów, szczególnie w pierwszej, krytycznej fazie dojrzewania. Stosunek ilościowy sterydów zbadany w niestatycznym systemie hodowli jest podobny do znalezionego w płynie pęcherzykowym przedowulacyjnych pęcherzyków jajnikowych, w którym poziom estrogenów jest wysoki, a progesteronu niski. Taki stan utrzymywany jest do drugiej połowy procesu dojrzewania, kiedy to obserwuje się raptowny wyrzut progesteronu (32). Interesujący jest fakt, że dodanie do hodowli komórek pęcherzykowych pozostaje bez korzystnego wpływu na oocyty pozbawione kumulusa, pobudza jednak do prawidłowego rozwoju (37%) oocyty otoczone wieńcem promienistym (32). Wyniki tych doświadczeń przeczą przedstawionej we wcześniejszej pracy (35) hipotezie o pęcherzykowym pochodzeniu czynników hamujących dojrzewanie oocytów.

Fukui i wsp. (10) badali zdolność oocytów do dojrzewania *in vitro* w zależności od wielkości pęcherzyka jajnikowego z jakiego je pozyskano, obecności lub braku kumulusa, a także od fazy cyklu rujowego, w jakiej znajdował się jajnik, z którego pobrano oocyty (10). Według Dahlhausena i wsp. (7) lepiej dojrzewają oocyty bydłecze z pęcherzyków wielkości 3—6 mm (50% oocytów z ciałkami kierunkowymi) w porównaniu z pochodzącymi z pęcherzyków mniejszych niż 3 mm (47% ciałek kierunkowych) i większych niż 6 mm (40% ciałek kierunkowych). Inni autorzy (10, 19) nie stwierdzają istotnych różnic pod względem zdolności do dojrzewania między oocytami bydłeczymi pochodzącymi z pęcherzyków o różnej wielkości.

Zwarty lub lekko rozproszony kumulusa mały oocyty bydłecze pozyskane z małych pęcherzyków (3 mm i 3—6 mm) (7, 19). Fukui i Sakuma (10) zaobserwowali, że 86%—94% oocytów otoczonych prawidłowymi kumulusami pochodzi z pęcherzyków mniejszych niż 5 mm, zaś tylko 60%—70% takich samych oocytów z pęcherzyków o wielkości 6—20 mm. Notuje się wysoko istotne różnice w dojrzewaniu oocytów otoczonych prawidłowym kumulusem — 71% (19), 48,2% (10), 50% (7) i oocytów pozbawionych kumulusa — 44% (19), 32,4% (10), 0% (7).

Badania zależności między fazą cyklu płciowego i zdolnością oocytów do dojrzewania *in vitro* wykazały, że cechy degeneracji kumulusa i ooplazmy w najwyższym stopniu występują u oocytów pochodzących z jajników w fazie pęcherzykowej (19). Natomiast badacze japońscy (10) nie zaobserwowali istotnych różnic w tempie dojrzewania oocytów pochodzących z jajników w fazie lutealnej (49,6%) czy folikularnej (45,9%).

Wydaje się więc, że zastosowanie właściwych warunków hodowli pozwoli na pozyskanie du-

zej liczby w pełni dojrzałych oocytów zarówno do badań podstawowych, jak i zabiegów transplantacji i manipulacji zarodkami.

Piśmiennictwo

1. Ayalon N.: *J. Reprod. Fert.* 53, 1, 1978.
2. Bae I. H., Foot R. H.: *J. Reprod. Fert.* 52, 357, 1975.
3. Ball G. D., Leibfried M. L., Lenz R. W., Ar R. L., Bavister B. D., First N. L.: *Biol. Reprod.* 28, 717, 1983.
4. Bavister B. D.: In vitro fertilization: principles, practice and potential. In vitro fertilization and embryo transfer. E. S. E. Hafez, Detroit, Michigan USA, HTP Press Limited International Medical Publishers. 1982.
5. Brackett B. G.: *Theriogenology.* 19, 1, 1983.
6. Cross P. C., Brinster R. L.: *Biol. Reprod.* 3, 298, 1970.
7. Dahlhausen R. D., Bohnam J. B., Meyers G., Ludwick M. T.: *Theriogenology.* 15, 11, 1981.
8. Edwards R. G.: *Nature.* 23, 349, 1965.
9. Fukui Y., Sakuma Y.: *Biol. Reprod.* 22, 669, 1980.
10. Fukui Y., Fukushima M., Terawaki Y., Ono H.: *Theriogenology.* 18, 161, 1982.
11. Fukushima M., Fukui Y.: *Anim. Reprod. Sci.* 9, 323, 1985.
12. Gérard M., Menezo Y., Rombauts P., Szöősi D., Thibault C.: *Ann. Biol. Anim. Bioch. Biophys.* 12, 1521, 1979.
13. Greve T., Bosquet D., King W. A.: *Theriogenology.* 22, 151, 1984.
14. Hensleigh H. C., Hunter A. G.: *J. Dairy Sci.* 68, 1456, 1985.
15. Iritani A.: *Androl. Arch.* 5, 77, 1985.
16. Jalabert B.: *J. Fish Res. Bd. Can.* 33, 974, 1976.
17. Kątska L., Smorąg Z.: *Anim. Reprod. Sci.* 9, 205, 1985.
18. Leibfried-Rutledge M. L., Crister E. S., First M. L.: *Theriogenology.* 23, 753, 1985.
19. Leibfried L., First N. L.: *J. Anim. Sci.* 48, 76, 1979.
20. Lieberman M. E., Tsafiri A., Bauminger S., Collins W. P., Ahren K., Lindner H. R.: *Acta Endocr.* 83, 151, 1976.
21. Lorton S. P., First N. L.: *Biol. Reprod.* 21, 301, 1979.
22. Masui Y.: *J. Exp. Zool.* 166, 365, 1967.
23. McCaughey R. W.: *Endocrinology.* 100, 39, 1977.
24. Moor R. M.: *Ann. Biol. Anim. Bioch. Biophys.* 18, 477, 1978.
25. Moor R. M., Crosby J. M.: *J. Reprod. Fert.* 75, 467, 1985.
26. Moor R. M., Polge C., Willadsen S. M.: *J. Embryol. Exp. Morph.* 56, 319, 1980.
27. Moor R. M., Trounson A. O.: *J. Reprod. Fert.* 49, 101, 1977.
28. Moor R. M., Warens G. M.: Regulation of oocyte maturation in mammals. W: Control of ovulation. Wyd. Cvighton D. B., Foxcroft G. R., Haynes N. B., Lamming G. E., London. Butterworths, 1978, s. 159.
29. Racowsky C., McCaughey R. W.: *J. Reprod. Fert.* 66, 505, 1982.
30. Shea B. F., Janzen R. E., Alister R.: *Theriogenology.* 3, 385, 1983.
31. Smith L. D., Echer R. E., Subtelny S.: *Devl. Biol.* 17, 627, 1968.
32. Staigmiller R. B., Moor R. M.: *Gamete Res.* 9, 221, 1984.
33. Thibault C.: *J. Reprod. Fert.* 51, 1, 1984.
34. Trounson A. O., Willadsen S. M., Rowson L. E. A.: *J. Reprod. Fert.* 51, 321, 1977.
35. Tsafiri A., Dekel N., Bar-Ami S.: *J. Reprod. Fert.* 64, 541, 1982.
36. Tsafiri A., Lieberman M. E., Argen K., Lindren H. R.: *Acta Endocr.* 81, 362, 1979.
37. Wright R. W., Biondoli K. R.: *J. Anim. Sci.* 53, 702, 1981.

Adres autora: mgr inż. Urszula Strzałkowska-Eysmont, ul. Meander 1A m. 32, 02-791 Warszawa

ROMAN SŁAWETA, WACŁAW AKSIUTO*

Wartość biologiczna nasienia buhajów konserwowanego z egzogennym zredukowanym glutationem określona na podstawie cielności i wycieleń u krów

Institut Fizjologii i Żywienia Zwierząt PAN, ul. Instytucycka 3, 05-110 Jabłonna
* Stacja Hodowli i Unasieniania Zwierząt, ul. Bydgoska 1/8, 10-243 Olsztyn

Zredukowany glutation (GSH) w nasieniu buhaja odgrywa ważną rolę w ruchliwości, metabolizmie oraz przeżywalności plemników (3, 7, 8, 9, 11, 14). Wykazany jest także udział egzogennego GSH w podtrzymywaniu zdolności zapładniającej plemników buhaja, aczkolwiek wskaźnik cielności u krów charakteryzował się dużą zmiennością (1, 12).

W związku z powyższym uzasadnione wydaje się przedstawienie wyników badań nad wpływem dodatku zredukowanego glutationu do mrożonego nasienia buhajów na cielność u krów. Jednocześnie w celu pełniejszego udokumentowania doświadczenia, określono wskaźnik wycieleń.

Materiał i metody

Do badań wykorzystano nasienie 4 buhajów w wieku 18 miesięcy użytkowanych do rozrodu w Stacji Hodowli i Unasieniania Zwierząt w Olsztynie. Od każdego buhaja w odstępach około 15-minutowych, pobrano po 2 ejakulatory, które następnie łączono i określano koncentrację plemników w 1 ml nasienia metodą fotometryczną. Ejakulatory, których odsetek plemników o ruchu postępowym był wyższy niż 60% dzielono na dwie równe porcje i konserwowano w rozrzedzalniku mlekowo-żółtkowo-glicerolowym. Szczegółowe postępowanie metodyczne opisano w poprzedniej pracy (10). Próbę biologiczną przeprowadzono na 179 krowach unasienionych po raz pierwszy, w tym 91 nasieniem bez GSH i 88 nasieniem z GSH. Zabiegi

unasieniania w okresie letnim wykonywało dwóch inseminatorów. Krowy pochodziły z gospodarstw uświadczonych. Wszystkie czynności techniczne związane z zabiegiem unasieniania przeprowadzono według metody rutynowej zalecanej przez SHiUZ. Skuteczność zabiegów ustalono na podstawie badania w celu stwierdzenia ciąży wykonywanego przez lekarza weterynarii powyżej 90 dnia od daty pierwszego unasieniania oraz dat urodzeń cieląt.

W celu określenia zależności między buhajami a cielnością u krów unasienionych bez i ze zredukowanym glutationem, zastosowano test χ^2 z poprawką Yatesa na ciągłość (6). Przyjęto poziom istotności $p \leq 0.05$.

Wyniki i omówienie

Średni odsetek krów cielnych po pierwszej inseminacji nasieniem zawierającym GSH wyniósł 60,2% i był wyższy o 8,6% w stosunku do nasienia konserwowanego bez GSH. Uzyskane wartości χ^2 są znacznie niższe niż wartość graniczna właściwa dla $p \leq 0,05$ i świadczą o tym, że nie istnieją współzależności pomiędzy buhajami a liczbą krów cielnych i niecielnych, unasienionych bez i ze zredukowanym glutationem (tab. 1). Najwyższy odsetek zacielen stwierdzono u krów unasienionych nasieniem z dodatkiem GSH pozyskanym od buhajów o nazwach. Bruk i Bryk — po 66,7% i liczba ta była wyższa w stosunku do nasienia bez GSH, odpo-