

Test penetracji oocytów chomiczych jako wstępna ocena płodności lisów polarnych

JOANNA SOLIŃSKA, BOGDAN JANICKI, PAWEŁ ŁAKOTA*

Katedra Biologii Małych Przeżuwaczy i Biochemii Środowiska, *Katedra Biotechnologii Zwierząt
Wydziału Zootechnicznego ATR, ul. Mazowiecka 28, 85-084 Bydgoszcz

Solińska J., Janicki B., Łakota P.

Zona free hamster ova test as preliminary assessment of the fecundity of polar foxes

Summary

One of the methods of functional assessment of semen is the zona free ova test of an egg cell devoid of zona pellucida, as a result of treating it with trypsyne. This test facilitates checking the interactions between a spermatozoon and an egg cell and determining the fertilization potential of spermatozoa. The material used for the study was sperm collected by using the massage method from 18 polar foxes. Next, oocytes devoid of zona pellucida were introduced into the breeding medium and incubated together with the spermatozoa. Percoll's gradient (Pharmacia, Uppsala Sweden) was used in order to separate the spermatozoa. The number of oocytes having both pronuclei (male and female) was determined, and these were used as the basic indicator of proper insemination. The study also took into account the number of oocytes which indicated so-called parthenogenic development (1 pronucleus) as well as those which underwent polyspermic insemination (3 or more pronuclei). The fertility (covering effectiveness) and profligacy of the investigated specimens was determined in order to assess the reproductive efficacy of male specimens on the basis of the number of covered female specimens, the number of whelped female specimens and the number of puppies. The investigated population was characterized by high breeding effectiveness which is supported by studies showing the high fertilization percentage of hamster oocytes in the zona free ova test (67.1%) and their breeding results (fertility 91.02%, profligacy 9.28). The results of the study indicate the utility of the zona free ova test in assessing fertilization capacity of spermatozoa and semen fertility in polar foxes.

Keywords: polar fox, zona free hamster ova test, reproduction

Cechy związane z reprodukcją mają decydujący wpływ na efektywność produkcji zwierzęcej. Rozród zwierząt, w tym rozród zwierząt futerkowych, jest zagadnieniem niezwykle złożonym, uzależnionym zarówno od założeń genetycznych osobnika, jak i czynników środowiskowych (12). Na uwagę zasługują testy funkcjonalnej oceny nasienia, które mogą dokładniej określić niektóre aspekty sprawności plemników. Zalicza się do nich test penetracji oocytów chomika. Pozwala on na obserwowanie interakcji pomiędzy plemnikiem a komórką jajową i umożliwia ustalenie zdolności plemników do zapłodnienia (5, 7, 15).

Dojrzały oocyt ssaka jest otoczony osłonką jajową zbudowaną z glikoprotein. Nosi ona nazwę osłonki przejrzystej (*zona pellucida*) i odgrywa istotną rolę we wzajemnym rozpoznaniu się oraz związaniu plemnika i komórki jajowej. Ważnym etapem oddziaływania tych komórek jest reakcja akrosomowa plemnika indukowana przez oocyt. Reakcja akrosomowa polega na tym, że z akrosomu plemnika uwalniają się przez egzocytózę liczne enzymy, m.in. hialuronidaza i akrosyna (EC 3.4.21.10), które ułatwiają jego oddziaływa-

nie z osłonką przejrzystą jaja, a przede wszystkim umożliwiają plemnikowi przedostanie się przez tę osłonkę. Wiązanie plemnika przez osłonkę przejrzystą jest tym etapem zapłodnienia, o którym decyduje specyficzność gatunkowa. Mechanizm wykluczający wnikanie plemników należących do obcego gatunku działa również na poziomie błony komórkowej jaja, nie jest to jednak mechanizm tak restrykcyjny, jak w wypadku wiązania na osłonce przejrzystej. Dzięki temu do oocytów chomika pozbawionych sztucznie osłonki przejrzystej mogą wnikać plemniki innych gatunków zwierząt (14). Badania z wykorzystaniem pozbawionych osłonki przejrzystej oocytów chomika (14) sugerują, że morfologicznie nieprawidłowy plemnik ma niższą zdolność penetracji oolemy (9). Odkrycie przez Yanagimachi (14) faktu, że plemnik może penetrować pozbawione osłonki przejrzystej oocyty chomicze oraz wytwarzać w ich ooplazmie struktury przypominające męskie przedjądra, dało podstawę testu heterologicznego SPA (Sperm Penetration Assay). W tym przypadku wykorzystuje się dojrzałe oocyty, które nie uległy zapłodnieniu pozaustrojowe-

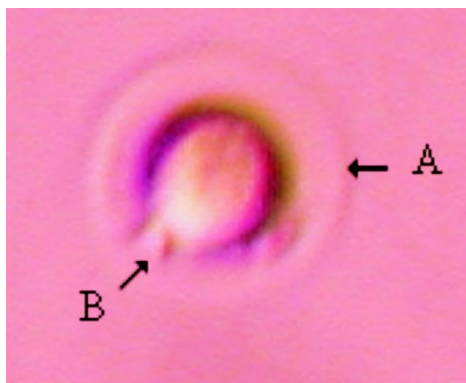
mu. Po 24-36 godzinach od inseminacji nie posiadają już potencjału rozwojowego z uwagi na starzenie się, natomiast zachowują zdolność do wiązania i penetracji przez plemniki (10). Oocyty wykorzystywane do testu powinny znajdować się w stadium metafazy II pierwszego podziału mejozy (M II) i mieć prawidłowy wygląd. W przypadku tego testu brak zapłodnień jest zazwyczaj spowodowany czynnikiem męskim, a nie jakością oocytów (5). Ocena przydatności tego testu, w przypadku nasienia osobników męskich, w porównaniu z innymi cechami plemników, jak: ruchliwość, morfologia czy zdolność odbycia reakcji akrosomalnej wykazała największą wartość predykcyjną (16).

Wyniki badań Ivanova i wsp., (6) oraz Peña i wsp., (11) dotyczące nasienia psów potwierdzają, że test wiązania plemników z oolemmą oocytów może mieć wartość prognostyczną w przewidywaniu ich zdolności do zapłodnienia. Brak piśmiennictwa na temat użyteczności testu penetracji przy ocenie zdolności zapładniającej plemników i płodności nasienia lisów polarnych w literaturze światowej spowodował podjęcie poniżej opisanych badań.

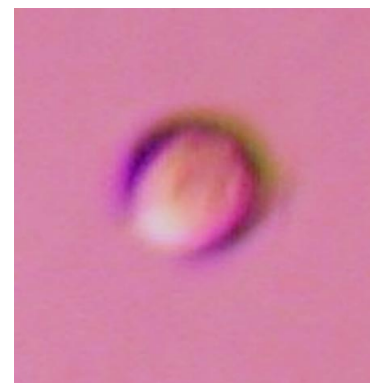
Materiał i metody

Nasienie do badań pobrano od grupy 18 lisów polarnych (*Alopex lagopus*) (sześciu dwuletnich i dwunastu jednorocznych). Uzyskano je metodą masażu, do zbiorniczków z płaszczem wodnym o temperaturze 37-38°C. Nasieniem pobranym od jednego osobnika inseminowano od 7 do 12 samic. Przed przystąpieniem do wykonania testu samice chomicze poddano stymulacji hormonalnej. Hiperstymulacja oraz poubojowe pobranie oocytów z pęcherzyków antralnych przy pomocy metody aspiracji zostały przeprowadzone w Zakładzie Genetyki Człowieka PAN w Poznaniu. Następnie oceniono stopień dojrzałości oocytów i wybrano do testu tylko te, które uzyskały pełną dojrzałość cytoplazmatyczną i jądrową (M II) (ryc. 1) Procedurę enzymatycznego usunięcia osłonki przejrzystej przeprowadzono za pomocą trawienia roztworem trypsyny (ryc. 2).

Celem wykonania testu penetracji oocyty pozbawione otoczki przejrzystej wprowadzono do medium hodowlanego (Universal IVF Medium) i przeprowadzono wspólną inkubację oocytów z plemnikami. Do rozdziału plemników został wykorzystany komercyjnie dostępny związek – Percoll (Pharmacia, Uppsala Sweden) (8). Metoda ta polega na wirowaniu plemników w gradientach różnych stężeń koloidalnych roztworów krzemu. Koncentracja plemników wynosiła 100 000/ml, a liczba oocytów wahała się w zależności od osobnika od 7 do 10. Proces inkubacji przeprowadzono w atmosferze 5% CO₂, w temperaturze 37°C i pełnej wilgotności, przez okres 16-18 godzin. Następnie po inkubacji przeprowadzono ocenę liczby plemników, które związały się z cytoplazmą oocytów i uległy w niej dekondensacji. Oceny zapłodnienia dokonano przy pomocy mikroskopu odwróconego, z użyciem kontrastu PlasDIC



Ryc. 1. Pobrany oocyt chomika, stadium M II (widoczna osłonka przejrzysta – A i ciało kierunkowe – B)



Ryc. 2. Oocyt chomika pozbawiony osłonki przejrzystej

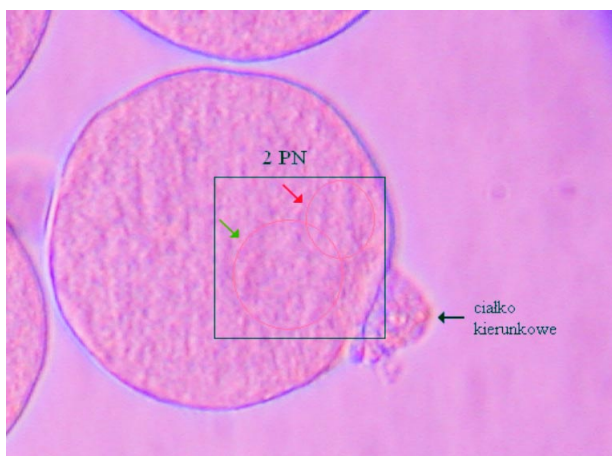
Zeiss LD A PLAN (pow. 400 ×). Jako podstawowy wskaźnik prawidłowego zapłodnienia określono liczbę oocytów, które charakteryzowała obecność obydwu przedjądrzy (męskiego i żeńskiego). W analizie uwzględniono również liczbę oocytów, które wykazały tzw. rozwój partenogenetyczny (1 przedjądrze) oraz oocyty, które uległy zapłodnieniu polispermicznemu (3 i więcej przedjądrzy).

W celu oceny zdolności reprodukcyjnej samców na podstawie liczby samic pokrytych, liczby samic wyszczenionych i liczby urodzonych szczeniąt ustalono płodność (skuteczność pokrycia) i plenność badanych osobników.

Tab. 1. Wyniki testu penetracji komórki jajowej chomika pozbawionej osłonki (zona free hamster ova test)

Nr lisa	Liczba oocytów przypadająca na jednego osobnika	Oocyty			
		DEG. (%)	1 PN (%)	2 PN (%)	3 PN (%)
1*	7	1 (14,3)	–	5 (71,4)	1 (14,3)
2*	7	1 (14,3)	1 (14,3)	5 (71,4)	–
3*	7	2 (28,6)	–	5 (71,4)	–
4*	7	1 (14,3)	2 (28,6)	4 (57,1)	–
5*	7	2 (28,6)	1 (14,3)	4 (57,1)	–
6*	9	1 (11,0)	1 (11,0)	6 (67,0)	1 (11,0)
7	7	2 (28,6)	1 (14,3)	4 (57,1)	–
8	9	1 (7,4)	2 (14,8)	7 (77,8)	–
9	10	1 (10,0)	1 (10,0)	7 (70,0)	1 (10,0)
10	7	1 (14,3)	–	5 (71,4)	1 (14,3)
11	8	1 (12,5)	1 (12,5)	6 (75,0)	–
12	9	2 (22,0)	1 (11,0)	6 (67,0)	–
13	8	2 (25,0)	–	6 (75,0)	–
14	7	1 (14,3)	2 (28,6)	4 (57,0)	–
15	8	2 (25,0)	–	6 (75,0)	–
16	8	2 (25,0)	1 (12,5)	5 (62,5)	–
17	9	2 (22,0)	1 (11,0)	6 (67,0)	–
18	7	2 (28,6)	–	4 (57,0)	1 (14,3)

Objaśnienia: * – lisy dwuletnie; DEG – oocyty zdegradowane; 1 PN – partenogeneza; 2 PN – zapłodnienie; 3 PN – polispermia



Ryc. 3. Zapłodniony oocyt w teście penetracji (obecność przedjądrzy: męskiego [→] i żeńskiego [→]) z wyrzuconym ciałkiem kierunkowym (obserwowane w pow. 400 ×, z użyciem kontrastu PlasDIC LD A-PLAN/Zeiss/)

Statystyczne opracowanie uzyskanych wyników dotyczące średnich arytmetycznych, odchyłeń standardowych oraz istotności różnic (test U Manna-Whitneya) przeprowadzono wykorzystując pakiet Statistica v. 5.0.

Wyniki i omówienie

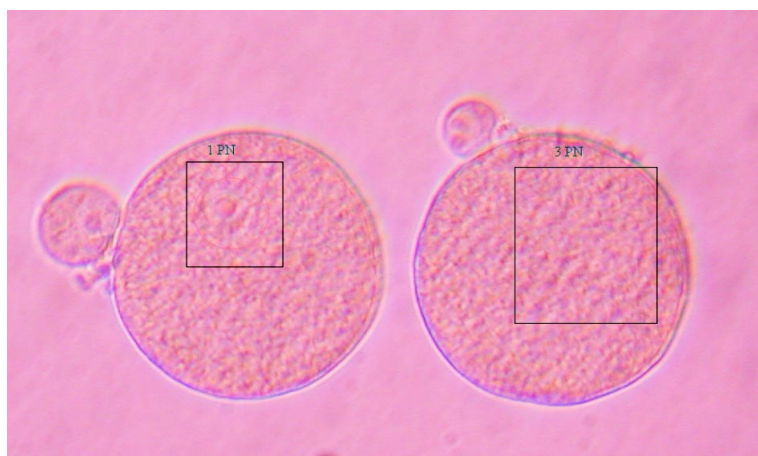
Wyniki testu penetracji komórek jajowych pozbawionych osłonki przejrzystej, w wyniku trawienia trypsyną, przedstawiono w tab. 1.

Liczba oocytów wynosiła w zależności od osobnika od 7 do 10. W ocenie uwzględniono komórki jajowe ze zmianami kształtu, struktury cytoplazmy i obecności organelli komórkowych określane jako zdegradowane, komórki jajowe zapłodnione oraz oocyty, które uległy zapłodnieniu polispermicznemu i wzbudzeniu partenogenetycznemu (ryc. 3, 4).

Partenogenezę można wywołać, działając na dojrzałe jajo bodźcami mechanicznymi, fizycznymi lub chemicznymi. U królika osiągnięto to pod wpływem szybkich zmian temperatury (szok termiczny), natomiast u myszy – poprzez działanie prądem elektrycznym. W przypadku badanych komórek jajowych zjawisko to mogło być spowodowane urazem mechanicznym, np. uderzeniem.

U większości zwierząt istnieją mechanizmy zabezpieczające przed zapłodnieniem komórki jajowej przez więcej niż jeden plemnik (7). Najczęstszym z nich jest tzw. blok przeciwko polispermii. Stopień nasilenia bloku polispermii na poziomie oolemy jest zależny od zmian w osłonce przejrzystej – nasilenia reakcji zony. U chomika zachodzi bardzo silna reakcja zony, a nie ma bloku polispermii na poziomie oolemy. Dzięki temu oocyty chomika pozbawione osłonki przejrzystej mogą być zapłodnione *in vitro* przez plemniki innych gatunków ssaków.

Procent zapłodnień kształtował się od 57 do 78. Stwierdzono nieznaczne różnice między lisami jednorocznymi (67,66%) i dwuletnimi (65,67%). Zbliżone



Ryc. 4. Oocyt partenogenetyczny – obecność 1 przedjądrza oraz oocyt zapłodniony polispermicznie – obecność 3 przedjądrzy (z użyciem PlasDIC)

wyniki, kształtujące się w granicach 62,06-80,95, dotyczące procentu zapłodnień oocytów chomiczych pozbawionych osłonki nasieniem lisów pospolitych otrzymali Barta i Babušík (1). W badaniach Yanagimachi (15) stwierdzono, że procent zapłodnionych oocytów chomika pozbawionych osłonki przejrzystej przez plemniki męskie kształtował się w granicach 69,3%. Procent zapłodnień nasieniem buhaja w teście penetracji kształtował się od 34,2 do 53,7 i był ściśle związany z rodzajem medium stosowanym do kapacytacji (5). W badaniach nad niepłodnością męską udział zapłodnień (2 PN) wynosił 76,7%, natomiast udział oocytów z polispermia i wzbudzonych patogenetycznie wynosił odpowiednio 6,2 i 17,1% (13).

Zdolność plemników do penetracji pozbawionych osłonki przejrzystej oocytów chomiczych może być przydatnym testem w ocenie płodności samców (2). Wyniki badań autorów (6, 11) dotyczące nasienia psów wskazują, że test wiązania plemników z osłonką przejrzystą oocytów może mieć wartość prognostyczną w przewidywaniu ich zdolności zapładniającej.



Ryc. 5. Zapłodnione komórki jajowe (obecność przedjądrzy: męskiego [→] i żeńskiego [→]) (obserwowane w pow. 400 ×, z użyciem kontrastu PlasDIC)

Tab. 2. Wyniki rozrodu badanych lisów (n = 18)

Nr lisa	Liczba samic pokrytych	Liczba samic wyszczenionych (skuteczność pokryć w %)	Liczba urodzonych szczeniąt (plenność)
1*	12	11 (91,67)	112 (10,18)
2*	10	9 (90,00)	82 (9,11)
3*	12	11 (91,66)	90 (8,18)
4*	7	6 (85,71)	45 (7,50)
5*	11	9 (81,82)	68 (7,56)
6*	12	11 (91,67)	101 (9,18)
7	11	10 (90,91)	108 (10,80)
8	10	10 (100,00)	106 (10,60)
9	10	9 (90,00)	86 (9,56)
10	11	10 (90,91)	104 (10,40)
11	12	11 (91,67)	100 (9,09)
12	10	9 (90,00)	83 (9,22)
13	11	10 (90,90)	89 (8,90)
14	10	9 (81,81)	82 (9,11)
15	8	8 (100,00)	78 (9,75)
16	12	11 (94,12)	103 (9,36)
17	11	10 (90,91)	96 (9,60)
18	9	8 (88,89)	72 (9,00)
\bar{x}	10,5	9,56 (91,02)	89,17 (9,28)
S_x	1,42	1,34 (4,09)	16,88 (40,91)
min.	7	6 (81,82)	45 (7,5)
max.	12	11 (100)	112 (10,80)
V (%)	13,57	14,00 (4,50)	18,93 (9,85)

Objaśnienie: * – lisy dwuletnie

Wyniki zapłodnień w teście penetracji korespondowały z wysokimi wynikami rozrodu (tab. 2), co pozwala stwierdzić, że test penetracji jest dobrym wskaźnikiem predykcyjnym i może być stosowany w przewidywaniu wyników rozrodu u badanej populacji lisów.

Skuteczność pokrycia wynosiła średnio 91,02%, natomiast plenność 9,28. Analiza statystyczna wykazała, że wiek nie różnicował istotnie skuteczności pokrycia i plenności badanych osobników, które wynosiły odpowiednio 88,76% i 8,62 dla lisów dwuletnich oraz 92,15% i 9,62 dla osobników jednorocznych. Wysoka wartość biologiczna nasienia badanego w ciągu całego sezonu rozrodczego przełożyła się na wysokie wyniki rozrodu. Na tle danych piśmiennictwa (3), dotyczących płodności i plenności samic, badana populacja charakteryzowała się wysokim i wyrównanym poziomem reprodukcji.

Podsumowując, badana populacja charakteryzowała się wysoką efektywnością rozrodczą, co potwierdzają wysoki procent zapłodnień oocytów chemicznych w teście penetracji i wyniki rozrodu. Wysoka wartość biologiczna nasienia lisa polarnego, stwierdzona w teście

penetracji oocytów chemicznych, przełożyła się na bardzo dobre wyniki rozrodu.

Piśmiennictwo

- Barta M., Babušik P.: Hodnotenie spermogénezy a fertilizačnéj kapacity ejakuláv inaktívnych lišakov (*Vulpes vulpes*) testom penetračnej schopnosti. Acta zootechn. Univ. Agric. Nitra 1993, 48, 57-65.
- Berger T., Horton M. B.: Evaluation of assay conditions for the zona-free hamster ova bioassay of boar sperm fertility. Gamete Res. 1988, 19, 101-111.
- Brzozowski M.: Studia nad rozplodem lisów w Polsce. Rozprawy Naukowe i Monografie, SGGW Warszawa 1995.
- Franken D. R., Acosta A. A., Kruger T. F., Lombard C. J., Oehninger S., Hodgen G. D.: The hemizona assay: its role in identifying male factor infertility in assisted reproduction. Fertil. Steril. 1993, 59, 1075-1080.
- Iqbal N., Hunter A. G.: Comparison of bovine sperm capacitation systems for ability of sperm to penetrate zona-free hamster oocytes and bovine oocytes in vitro. J. Dairy Science 1995, 78, 77-83.
- Ivanova M., Mollova M., Ivanova-Kicheva M. G., Petrov M., Djarkova T., Somlev B.: Effect of cryopreservation of zona – binding capacity of canine spermatozoa in vitro. Theriogenology 1999, 52, 163-170.
- Krzyszowska H., Sokół-Misiak W.: Molekularne mechanizmy rozwoju zarodkowego. Wydawnictwo naukowe PWN, Warszawa 2002.
- Makler A., Stoller J., Makler-Shiran E.: Dynamic aspects concerned with the mechanism of separating motile sperm from nonmotile sperm, leukocytes, and debris with the use of high-density Percoll gradients. Fertil. Steril. 1998, 70, 961-966.
- Marsh S. K., Bolton V. N., Braude P. R.: The effect of morphology on the ability of human spermatozoa to penetrate zona-free hamster oocytes. Hum. Reprod. 1987, 2, 499-503.
- Oehninger S., Acosta A. A., Veeck L., Brzyski R. G., Kruger T. F., Muasher S. J., Hodgen G. D.: Recurrent failure of in vitro fertilization: role of the hemizona assay (HZA) in the sequential diagnosis of specific sperm/oocyte defects. Am. J. Obstet. Gynecol. 1991, 164, 1210-1215.
- Peña A. I., Barrio M., Becerra J. J., Quintela L. A., Herradón P. G.: Zona pellucida binding ability and responsiveness to ionophore challenge of cryopreserved dog spermatozoa after different periods of capacitation in vitro. Animal Reprod. Science 2004, 84, 193-210.
- Socha S., Mazur M., Gajzler W., Dąbrowska D., Krawczyk E., Jeżewska G.: Wpływ pochodzenia i wieku samic na cechy reprodukcyjne lisa pospolitego srebrzystego (*Vulpes vulpes* L.). Zesz. Nauk. PTZ 1999, 42, 105-115.
- Yamauchi Y., Yanagimachi R., Horiuchi T.: Full-term development of golden hamster oocytes following intracytoplasmic sperm head injection. Biol. Reprod. 2002, 67, 534-539.
- Yanagimachi R.: Zona-free hamster eggs: their use in assessing fertilizing capacity and examining chromosomes of human spermatozoa. Gamete Res. 1984, 10, 187-232.
- Yanagimachi R., Yanagimachi H., Rogers J.: The Use of Zona-Free Animal Ova as a Test-System for the Assessment on the Fertilizing Capacity of Human Spermatozoa. Biol. Reprod. 1976, 15, 471-476.
- Yogev L., Gamzu R., Botchan A., Hauser R., Paz G., Yavetz H.: Zona pellucida binding improvement effect of different sperm preparation techniques is not related to changes in sperm motility characterizations. Fertil. Steril. 2000, 73, 1120-1125.

Adres autora: prof. dr hab. Bogdan Janicki, ul. Mazowiecka 28, 85-084 Bydgoszcz; e-mail: janicki@atr.bydgoszcz.pl