

# Wpływ komórek ziarnistych i pożywek hodowlanych na kompetencje mejotyczne oocytów bydła oraz ich zdolność do rozwoju po zapłodnieniu *in vitro*

WIESŁAWA MŁODAWSKA, EWA PŁOSZAJ

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

Młodawska W., Płoszaj E.

## Effect of granulosa cells and culture media on the meiotic competence of cattle oocytes and their developmental capacity after *in vitro* fertilization

### Summary

The aim of the study was to compare the effect of gonadotropic hormones and granulosa cells on the maturation and developmental capacity of cattle oocytes *in vitro*, as well as the effect of TCM 199 and DMEM/F12 media on the development of embryos obtained in co-culture with oviduct epithelial cells. Fertilization was performed with the use of frozen semen from 2 bulls. Twenty hours after insemination, presumptive zygotes were placed in co-culture with oviduct cells in a TCM 199 (TCM-KJ co-culture) or a DMEM/F12 medium (DMEM-KJ co-culture) and cultured for 7-9 days. Metaphase II was reached by 40% and 48% of oocytes cultured in the presence of granulosa cells and gonadotropins, respectively. Only embryos obtained from oocytes maturing in the presence of granulosa cells developed to the blastocyst stage. Considerably more dividing embryos were obtained when the presumptive zygotes were co-cultured with TCM-KJ (38.1%) rather than with DMEM-KJ (8.6%;  $P < 0.01$ ). This study showed that the presence of granulosa cells had no effect on the nuclear maturation of cattle oocytes, but increased their capacity for embryonic development. TCM 199 is much more useful than DMEM/F12 for the co-culture of cattle embryos with oviduct cells.

**Keywords:** cattle, oocytes, *in vitro* maturation, *in vitro* fertilization, co-culture

Zdolność zapłodnionego oocytu do podziałów i rozwoju zarodkowego, a następnie implantacji i pełnego rozwoju płodowego w głównej mierze uzależniona jest od jakości samego oocytu, jego dojrzałości mejotycznej, cytoplazmatycznej i molekularnej (14). W warunkach fizjologicznych dwukierunkowa komunikacja pomiędzy komórkami ziarnistymi a oocytem jest warunkiem prawidłowego wzrostu zarówno pęcherzyka jajnikowego, jak też wzrostu i dojrzewania oocytu (4, 14). Komórki ziarniste wydzielają szereg substancji, które w sposób para/autokryny wzmacniają lub osłabiają oddziaływanie gonadotropin na oocyt, a dodane do pożywek hodowlanych wspomagają dojrzewanie *in vitro* oocytów wielu gatunków ssaków (2).

Proces rozpoczęcia transkrypcji genomu zarodka to jeden z najważniejszych etapów jego wczesnego rozwoju. Początkowo uważano, iż u bydła aktywacja genomu następuje w zarodkach 8-16-komórkowych, badania sugerują jednak, iż zjawisko to rozpoczyna się już w stadium 2-komórkowym (1). Hodowla wczesnych zarodków w kokulturze z komórkami somatycznymi, np. nabłonka jajowodu (KJ), warstwy ziarnistej (GCs) czy wątroby szczura bawolego ułatwia ich roz-

wój do stadium moruli/blastocysty (3, 5, 17). Zarodki wykazują dużą plastyczność rozwojową i do pewnego stopnia mogą kompensować brak potrzebnych składników lub rozwijać się w obecności substancji niepożądanych (18). Niewłaściwe żywienie matki (np. niedożywienie) w czasie ciąży czy nieodpowiednie składniki zawarte w pożywkach mogą jednak prowadzić do zaburzeń rozwojowych ujawniających się dopiero w okresie postimplantacyjnym lub nawet postnatalnym osobnika (6). Nie tylko dojrzałość oocytu, ale również warunki hodowli zarodków mają zatem istotny wpływ na ich potencjalną zdolność rozwojową. Celem badań było porównanie wpływu hormonów gonadotropowych i komórek ziarnistych na dojrzewanie i zdolność rozwojową *in vitro* oocytów bydła oraz ocena wpływu pożywek TCM 199 i DMEM/F12 na rozwój uzyskanych zarodków w kokulturze z komórkami nabłonka jajowodu.

### Materiał i metody

**Pozyskiwanie i hodowla oocytów oraz komórek jajowodowych.** Do badań wykorzystano 647 oocytów otoczonych wielowarstwowym wzgórkim jajonośnym (COCs),

pobranym z jajników po uboju 52 jałówek. COCs hodowano 23 godziny w pożywce TCM 199 z dodatkiem 0,1 g/l L-glutaminy, 75 mg/ml kwasu askorbinowego, 25 mg/ml alkoholu poliwinylowego, 1 mM/ml pirogronianu sodu, 20% FBS (Foetal Bovine Serum), 25 i.u./ml gentamycyny oraz A) 5 i.u./ml LH i 0,5 µg/ml FSH (pożywka TCM-H) lub B) komórek ziarnistych ( $3-5 \times 10^6$ /ml; żywka TCM-GCs). W TCM-H, po 13-31 COCs hodowano w 500 µl kroplach żywki w naczynkach 4-dołkowych; w TCM-GCs, na szalkach Petriego o średnicy 3 cm, (po 30-48 COCs/2 ml żywki). Po hodowli część oocytów utrwalono celem oceny stadium mejozy, pozostałe unasienniono plemnikami kapacytowanymi *in vitro*.

Komórki nabłonka jajowodu pobierano z wyizolowanych jajowodów, przemywano i zawieszano w 4 ml TCM 199 (kokultura TCM-KJ) lub DMEM/F12 (kokultura DMEM-KJ) z dodatkiem 10% FBS, 50 i.u./ml gentamycyny i 0,1 g/l L-glutaminy. Zawiesinę rozlewano do naczynek 4-dołkowych (po 500 µl/„dołek”) i umieszczano w inkubatorze. Na 12 godzin przed wprowadzeniem unasiennionych COCs w każdym „dołku” wymieniano po 200 µl żywki.

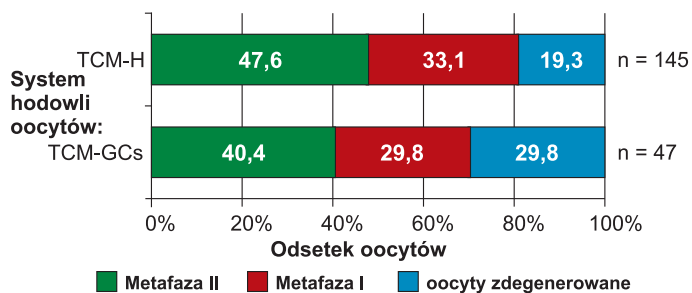
Do badań użyto odczynników firmy Sigma-Aldrich Co. (Schnelldors, Niemcy).

**Kapacytacja plemników i inseminacja oocytów.** Przed inseminacją COCs (n = 417) częściowo pozbawiano komórek wzgórką jajonośnego i umieszczano w 44 µl kroplach TALP-IVF (TALP z dodatkiem glukozy, 6 mg/ml BSA; Bovine Serum Albumin, 9 µg/ml heparyny oraz PHE: 20 µM penicylaminy, 10 µM hypotauryny i 2 µM epinefryny), na szalkach Petriego pod warstwą oleju parafinowego. Roztwór PHE przygotowano zgodnie z metodyką Miller i wsp. (11). Do zapłodnienia użyto nasienia mrożonego 2 buhajów, kapacytowanego z wykorzystaniem techniki „swim-up” (13). Następnie do kropli z oocytami wprowadzano około 50 000 plemników ruchliwych (w 6 µl TALP-IVF), uzyskując koncentrację  $1 \times 10^6$  plemników/ml żywki.

**Kokultura zarodków bydła w TCM-KJ i DMEM-KJ.** Po 18-20 godzinach od inseminacji oocyty (przypuszczalne zygoty; n = 396) bez oznak degeneracji w ooplazmie umieszczano w kokulturach TCM-KJ lub DMEM-KJ i hodowano 7-9 dni, wymieniając po 200 µl medium co około 48 godzin. Wszystkie inkubacje prowadzono w atmosferze 5% CO<sub>2</sub> i temperaturze 38,5°C.

**Ocena mikroskopowa oocytów i zarodków.** Po hodowli oocyty i zarodki utrwalano 24-48 godzin w zbuforowanej formalinie, barwiono fluorochromem Hoechst 33342 i oceniano w mikroskopie fluorescencyjnym przy pow. 400 ×. Wyróżniono następujące stadia mejozy: 1) metafaza I; 2) metafaza II; 3) oocyty zatrzymane w stadium diktiotenu lub zdegenerowane (brak chromatyny; fragmentacja; grudki chromatyny w ooplazmie) oraz rozwoju zarodkowego: 1) blastocysty; 2) morule; 3) zarodki kilkunastomerowe; 4) oocyty zapłodnione – w ooplazmie widoczne przedjądrza lub stadium metafazy II i rozluźniona główka plemnika; 5) oocyty niezapłodnione, zatrzymane w różnych stadiach podziału mejotycznego lub zdegenerowane. Ocenie stadium mejozy i rozwoju zarodkowego poddano 192 oocyty i 379 zarodków, pozostałe zagubiono lub zniszczono na różnych etapach doświadczenia.

**Opracowanie statystyczne.** Wyniki poddano analizie statystycznej za pomocą testu Z dla proporcji. Prawdopodobieństwo na poziomie  $P < 0,05$  uznano za istotne statystycznie.



Ryc. 1. Wpływ systemu hodowli na dojrzewanie oocytów bydła

## Wyniki i omówienie

W wyniku hodowli w pożywce TCM 199 z dodatkiem FSH i LH (TCM-H) lub komórek ziarnistych (TCM-GCs) podobny odsetek oocytów bydła uzyskał stadium metafazy I lub II (ryc. 1). Nie stwierdzono wpływu systemu hodowli na dojrzewanie jądrowe oocytów. Wynik ten potwierdza wcześniejsze badania, w których również nie odnotowano istotnego wpływu gonadotropin i/lub komórek ziarnistych na dojrzewanie jądrowe oocytów bydła, świni i koni (7, 10, 12).

W niniejszych badaniach stwierdzono istotny wpływ komórek ziarnistych na zdolność oocytów bydła do rozwoju zarodkowego. Ogółem, wyższy odsetek dzielących się zarodków uzyskano po zapłodnieniu oocytów dojrzewających w obecności GCs niż z oocytów hodowanych w pożywce TCM-H (81/224, tj. 36,2%; v.s. 22/155, tj. 14,1%  $P < 0,01$ ) i tylko w pierwszej grupie zarodki rozwinęły się do stadium blastocysty (tab. 1). Wynik ten wskazuje na pozytywny wpływ komórek ziarnistych na dojrzewanie cytoplazmatyczne oocytów bydła i ich zdolność do rozwoju po zapłodnieniu *in vitro*. Podobnie Fukui i Ono (7) lepszy wynik zapłodnienia i rozwoju zarodkowego uzyskali, gdy oocyty dojrzewały w obecności GCs niż FSH i LH. Niepełna dojrzałość cytoplazmy skutkuje zazwyczaj nieprawidłowym rozwojem przedjądrza męskiego lub/i powoduje asynchroniczne formowanie obu przedjądrzy (9). W niniejszych badaniach nie stwierdzono wpływu systemu hodowli na zdolność oocytów do formowania przedjądrza męskiego. Zarówno w grupie dojrzewającej w obecności GCs, jak i gonadotropin rozwój ok. 12% inseminowanych oocytów zatrzymał się w stadium jednokomórkowym (w ooplazmie widoczne były przedjądrza lub stadium metafazy II i zdekondensowana główka plemnika).

Warunki hodowli, w tym żywki i surowice, mogą mieć istotny wpływ na potencjał rozwojowy zarodków (18). Żywka TCM 199 (z dodatkiem surowicy lub bez) jest od wielu lat rutynowo stosowana do hodowli zarodków, ich współhodowli z komórkami somatycznymi lub sporządzania tzw. mediów kondycjonowanych (uzdatnianych) przez komórki somatyczne (3, 5, 17). Żywka DMEM/F12 bywa również wykorzystywana do hodowli zarodków bydła (17). W przeprowadzonych badaniach blastocysty i morule uzyskano tylko, gdy do współhodowli zarodków z komórkami jajowodowymi zastosowano żywkę TCM-199 (system TCM-KJ). W kulturze DMEM-KJ 71-79% inseminowanych oocytów zdegenerowało, uległo fragmentacji lub było niezapłodnionych (tab. 1). Należy podkreślić, że w pierwszych

Tab. 1. Wpływ systemów hodowli oocytów i pożywek na rozwój zarodków bydła *in vitro*

System hodowli oocytów	TCM-H			TCM-GCs		
	Kokultura:	DMEM-KJ n (%)	TCM-KJ n (%)	Razem n (= 100%)	DMEM-KJ n (%)	TCM-KJ n (%)
Stadium rozwoju po zapłodnieniu:						
Morule/*blastocysty	0	2 (2,5)	2 (1,3) <sup>X</sup>	0 <sup>c</sup>	14 (8,8) <sup>d</sup>	14 (6,2) <sup>Z</sup>
Zarodki 2-8-komórkowe	4 (5,3) <sup>a</sup>	16 (20,0) <sup>b</sup>	20 (12,9) <sup>X</sup>	8 (12,3) <sup>a</sup>	59 (37,1) <sup>b</sup>	67 (29,9) <sup>Y</sup>
Oocyty zapłodnione**	12 (16,0)	7 (8,7)	19 (12,3)	11 (16,9)	16 (10,1)	27 (12,1)
Oocyty niezapł./zdeg.***	59 (78,7)	55 (68,8)	114 (73,5) <sup>X</sup>	46 (70,8) <sup>a</sup>	70 (44,0) <sup>b</sup>	116 (51,8) <sup>Y</sup>
Razem (n = 100%)	75	80	155	65	159	224

Objaśnienia: \* blastocysty uzyskano tylko z oocytów dojrzewających w pożywce TCM-GCs i po zapłodnieniu hodowanych w kokulturze TCM-KJ; \*\* w cytoplazmie widoczne przedjądrza lub stadium metafazy II i rozluźniona główka plemnika; \*\*\* oocyty niezapłodnione zatrzymane w różnych stadiach podziału mejozy lub zdegenerowane. Wartości w rzędach oznaczone różnymi literami różnią się istotnie statystycznie: a, b = P < 0,01; c, d = P < 0,05; (dla porównania w obrębie systemu hodowli oocytów); X, Z = P < 0,02; X, Y = P < 0,01 (dla porównania pomiędzy systemami hodowli oocytów)

2-3 dniach współhodowli nie zaobserwowano wpływu systemu hodowli na proporcję dzielących się zarodków. W kolejnych dniach w kokulturze DMEM-KJ w większości zarodków stopniowo pojawiały się zmiany degeneracyjne. Zarodki takie usuwano z hodowli i utrwalano. Wybarwienie fluorochromem i ocena w mikroskopie fluorescencyjnym pozwoliły wykazać, iż to pozbawione jąder struktury przypominające blastomery. Trudno jednoznacznie stwierdzić, czy fragmentacji uległy niezapłodnione oocyty, czy komórki jajowe po wnikięciu plemnika. Znacznie mniej takich „zarodków” stwierdzono w kokulturze TCM-KJ. Równocześnie nie odnotowano negatywnego wpływu pożywki DMEM/F12 na morfologię i żywotność komórek jajowodowych w hodowli. Vansteenbrugge i wsp. (17) w uzdatnianych komórkami jajowodowymi pożywkach TCM-199 i DMEM/F12 uzyskali równorzędne proporcje blastocyst i zarodków 5-8-komórkowych. Autorzy ci nie dodali jednak surowicy do pożywek hodowlanych. W naszych badaniach oba media wzbogacone były 10% dodatkiem surowicy. Jak wiadomo, surowice i pożywki zawierają wiele różnych składników, które mogą wywierać pozytywny bądź negatywny wpływ na hodowane zarodki. Z analizy porównawczej składu pożywek wynika, że DMEM/F12 zawiera znacznie więcej glukozy i nikotynamidu, niż TCM 199. Badania wykazały, iż składniki te wywierają negatywny wpływ na rozwój zarodków (15, 16). Zastosowana w doświadczeniu surowica również zawierała glukozę. Prawdopodobnie w kokulturze DMEM-KJ nadmiar glukozy lub jakiejś innej substancji spowodował zmiany degeneracyjne w hodowanych zarodkach. U myszy kokultura 2-komórkowych zarodków z komórkami nerki afrykańskiej małpy zielonej w pożywce DMEM/F12 z dodatkiem surowicy nie wywiera negatywnego wpływu i umożliwia ich rozwój do stadium moruli/blastocysty (8). Reasumując, przeprowadzone badania potwierdzają pozytywny wpływ komórek ziarnistych na dojrzewanie cytoplazmatyczne oocytów bydła i ich zdolność do rozwoju zarodkowego i równocześnie wskazują, iż pożywka TCM 199 jest znacznie bardziej przydatna do rozwoju zarodków bydła w kokulturze z komórkami jajowodowymi niż DMEM/F12.

## Piśmiennictwo

1. *Bilodeau-Goeseels S., Panich P.*: Effects of oocyte quality on development and transcriptional activity in early bovine embryos. *Anim. Reprod. Sci.* 2002, 71, 143-155.
2. *Canipari R.*: Oocyte – granulosa cell interactions *Hum. Reprod.* 2000, 6, 279-289.
3. *Durnford R., Stubbings R. B., Ainsworth L.*: Evaluation of culture systems containing bovine oviduct epithelial cells or granulosa cells to mature and maintain the developmental competence of bovine oocytes *in vitro*. *Theriogenology* 1994, 42, 261-272.
4. *Eppig J. J.*: Oocyte control of ovarian follicular development and function in mammals. *Reproduction* 2001, 122, 829-838.
5. *Eyestone W. H., First N. L.*: Coculture of early cattle embryos to the blastocyst stage with oviductal tissue or in conditioned medium. *J. Reprod. Fert.* 1989, 85, 715-720.
6. *Fleming T. P., Kwong W. Y., Porter R., Ursell E., Fesenko I., Wilkins A., Miller D. J., Watkins A. J., Eckert J. J.*: The embryo and its future. *Biol. Reprod.* 2004, 71, 1046-1054.
7. *Fukui Y., Ono H.*: Effects of sera, hormones and granulosa cells added to culture medium for *in vitro* maturation, fertilization, cleavage and development of bovine oocytes. *J. Reprod. Fert.* 1989, 86, 501-506.
8. *Lai Y. M., Stein D. E., Soong Y. K., Tang Y. X., Grifo J., Malter H. E., Talansky B. E., Cohen J., Liu H. C., Rosenwaks Z.*: Evaluation of Vero cell co-culture system for mouse embryos in various media. *Hum. Reprod.* 1992, 7, 276-280.
9. *Laurinik J., Rath D., Niemann H.*: Differences in pronucleus formation and first cleavage following *in vitro* fertilization between pig oocytes matured *in vivo* and *in vitro*. *J. Reprod. Fert.* 1994, 102, 277-284.
10. *Leibfried L., First N. L.*: Effect of bovine and porcine follicular fluid and granulosa cells on maturation of oocytes *in vitro*. *Biol. Reprod.* 1980, 23, 699-704.
11. *Miller G. F., Gliedt D. W., Rakes J. M., Rorie R. W.*: Addition of penicillamine, hypotaurine and epinephrine (PHE) or bovine oviductal epithelial cells (BOEC) alone or in combination to bovine *in vitro* fertilization medium increases the subsequent embryo cleavage rate. *Theriogenology* 1994, 41, 689-696.
12. *Okólski A., Slonina D., Banasińska K.*: *In vitro* maturation of equine oocytes in co-culture with granulosa and theca interna cells. *Equine Vet. J. Suppl.* 1993, 15, 84-86.
13. *Parrish J. J., Krogenaes A., Susko-Parrish J. L.*: Effect of bovine sperm separation by either swim-up or Percoll method on success of *in vitro* fertilization and early embryonic development. *Theriogenology* 1995, 44, 859-869.
14. *Sirard M. A., Richard F., Blondin P., Robert C.*: Contribution of the oocyte to embryo quality. *Theriogenology* 2006, 65, 126-136.
15. *Takahashi Y., First N. L.*: *In vitro* development of bovine one-cell embryos: Influence of glucose, lactate, pyruvate, amino acids and vitamins. *Theriogenology* 1992, 37, 963-978.
16. *Tsai F. C., Gardner D. K.*: Nicotinamide, a component of complex culture media, inhibits mouse embryo development *in vitro* and reduces subsequent developmental potential after transfer. *Fertil. Steril.* 1994, 61, 376-382.
17. *Vansteenbrugge A., Van Langendonck A., Scutenaire C., Massip A., Dessy F.*: *In vitro* development of bovine embryos in Buffalo rat liver- or bovine oviduct-conditioned medium. *Theriogenology* 1994, 42, 931-940.
18. *Watson A. J.*: Oocyte cytoplasmic maturation: A key mediator of oocyte and embryo developmental competence. *J. Anim. Sci.* 2007, 85 (E. Suppl), E1-E3.

Adres autora: dr Wiesława Młodawska, Al. Mickiewicza 24/28, 30-059 Kraków; e-mail: rzmlodaw@cyf-kr.edu.pl