

Oocyty myszy stopniowo
rozwijają zdolność do aktywacji
podczas bloku w metafazie II

Jacek Z. Kubiak

Wprowadzenie

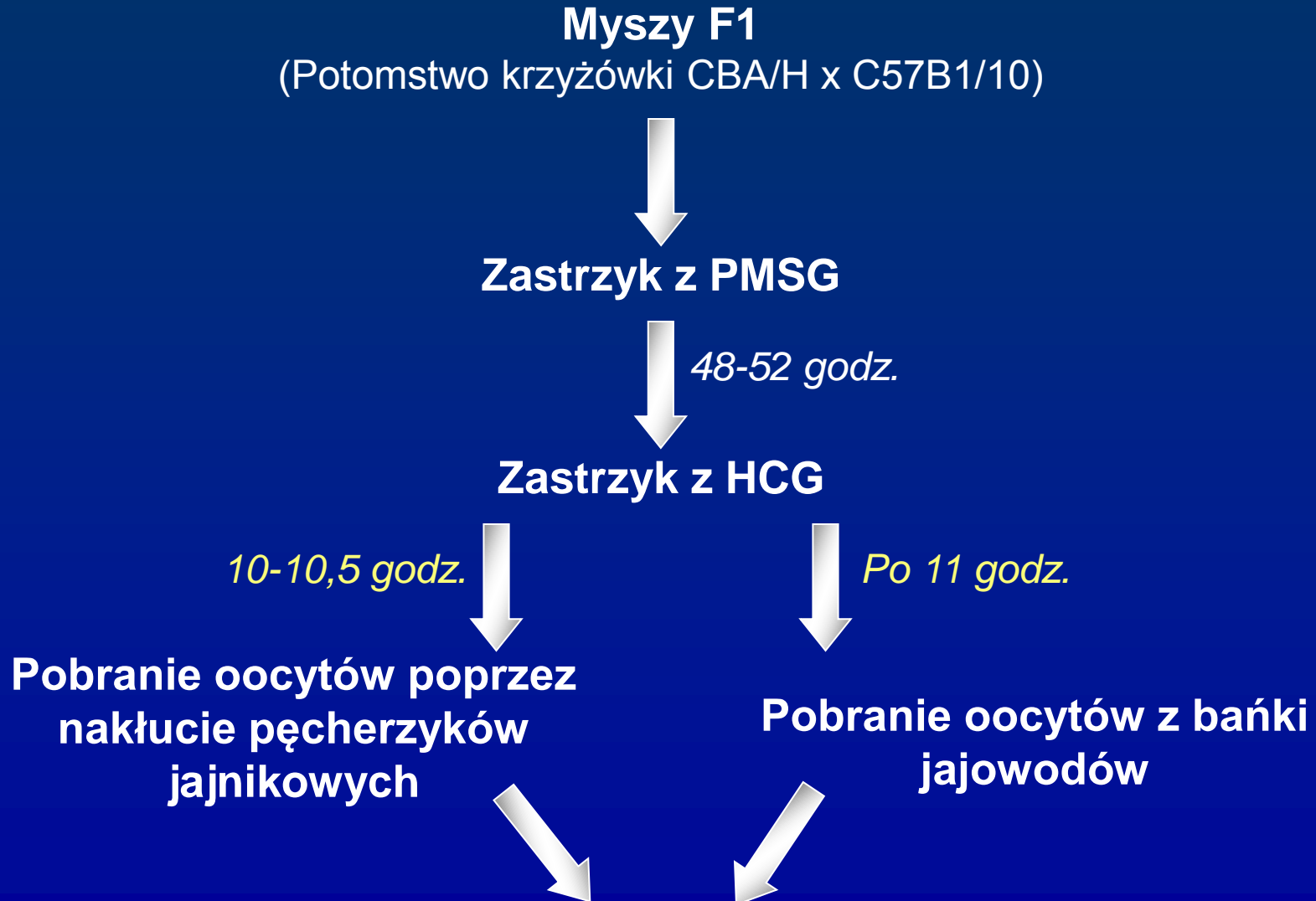
- W normalnych warunkach oocyty myszy są zapładniane podczas bloku metafazy II
 - Wniknięcie plemnika prowadzi do ukończenia II podziału meiotycznego, wyrzucenia II ciała kierunkowego i przejście do interfazy zygotycznej
 - Dojrzewające oocyty nie ulegają aktywacji po wniknięciu plemnika
 - Wniknięcie plemnika do oocytów w prometafazie I lub metafazie I (MI) prowadzi do utworzenia skondensowanych chromosomów z jądra plemnika
- Reakcja chromatyny plemnika i oocytu zależy od liczby plemników, które wniknęły:
- Wysoka polispermia → jądra przechodzą do interfazy
 - Mono- lub oligospermia → opóźnienie dojrzewania oocytu; nieznaczne wpłynięcie na skondensowaną morfologię chromosomów oocytu
 - 4-6 plemników → efekt pośredni: dojrzewanie często zablokowane w MI; chromosomy oocytu skondensowane; jądro plemnika nie tworzy chromosomów, pozostaje jako masa zrekonstruowanej chromatyny
- Podanie puromycyny lub cykloheksymidu (inhibitory syntezy białek) oocytom MI powoduje ich przejście do interfazy. Jednakże po usunięciu inhibitora chromatyna ponownie ulega kondensacji
 - Zahamowanie syntezy białka w oocytach MII skutkuje ich partenogenetyczną aktywacją

Cel

- Pokazanie, że zdolność do aktywacji mysich oocytów rozwija się stopniowo po tym jak wejdą w blok MII
- Czas nabycia zdolności do aktywacji zależy od sposobu aktywacji

Materiały i metody

Otrzymywanie i hodowla oocytów MII





Pożywki M2 + BSA



Roztwór hialuronidazy w PBS
(usunięcie kom. pęcherzykowatych)



Kwaśny roztwór Tyrode'a,
 α -hymotrypsyny lub 0,5% pronaza
(usunięcie osłonki przejrzystej)



Odpipetowanie I
ciałka kierunkowego

Dojrzewanie in vitro

Oocyty 4-tygodniowych samic F1 z nienaruszonym pęcherzykiem zarodkowym



Hodowla w pożywce Whitten'a pod płynną parafiną
(37°C; 5% CO₂)

Aktywacja partenogenetyczna

Traktowanie oocytów 8% roztworem etanolu



Płukanie w pożywce M2



Hodowla w pożywce M2 pod płynną parafiną
(37°C)

Zapłodnienie *in vitro*

Pobranie spermy 4-5-miesięcznych samców
F1 z ogona najądrzy



Kapacytacja
(1 godz. w pożywce Whittingham'a)
(37°C; 5% CO₂)



Rozcieńczenie zawiesiny plemników
(do 1×10^5 plemników/ml)



Zmieszanie zawiesiny plemników z oocytami
pozbawionymi osłonki przejrzystej



10 min.

Usunięcie oocytów z zawiesiny plemników

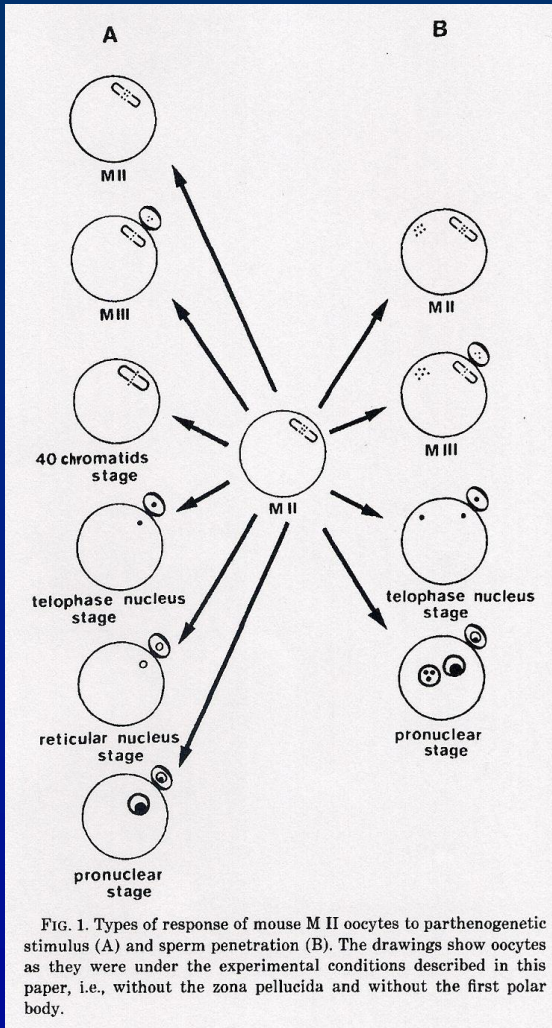
Czas

- Większość oocytów myszy F1 wyrzuca I ciałko kierunkowe 11 godz. po podaniu HCG
- Naturalny okres zapłodnienia *in vivo* wynosi od 13 do 18 godz. od podania HCG. Proces jest na pewno zakończony w 20 godz. od wstrzyknięcia HCG
- Okres czasu wybrany do doświadczeń (11-21,5 godz.) w pełni pokrywa okres w którym oocyty są naturalnie zapładniane

Aktywacja partenogenetyczna

Typy reakcji oocytów na stymulację partenogenetyczną:

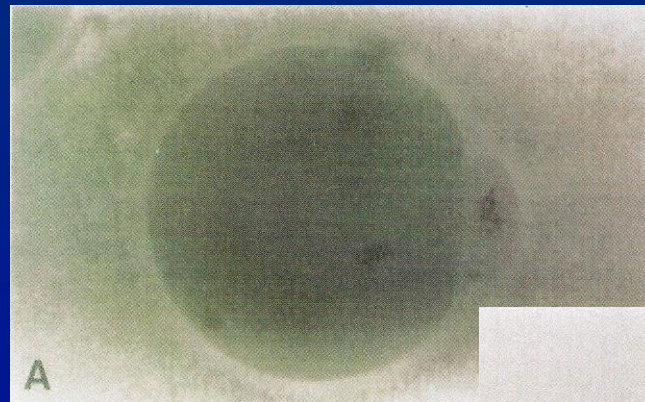
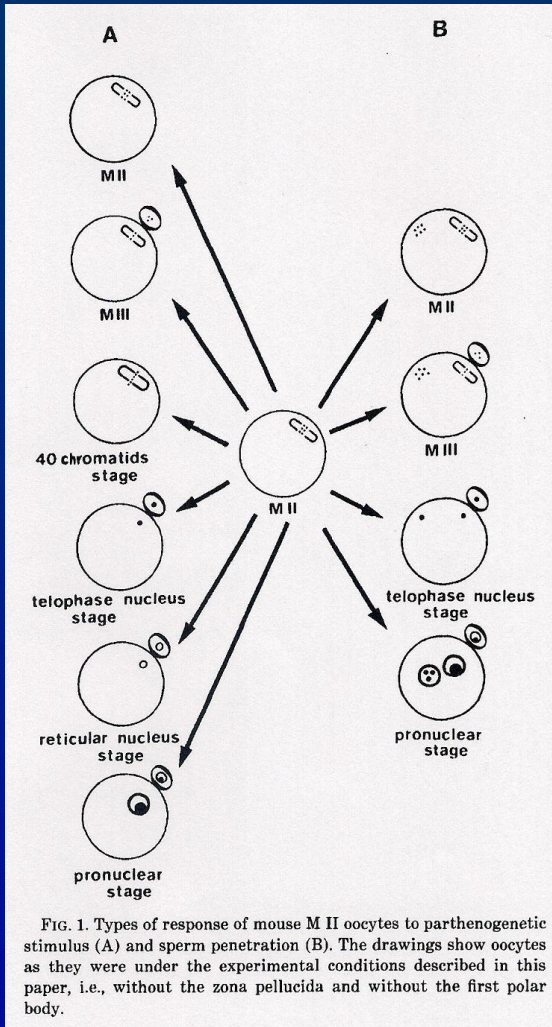
- MII (brak reakcji)



Aktywacja partenogenetyczna

Typy reakcji oocytów na stymulację partenogenetyczną:

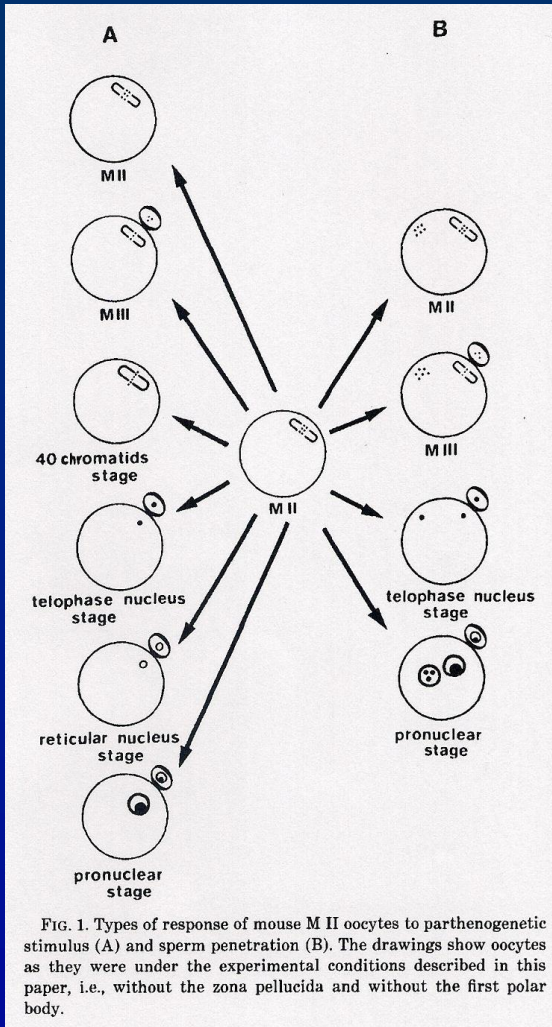
- MII (brak reakcji)
- MIII (przejdzie do kolejnej metafazy; wyrzucenie II ciała kierunkowego)



Aktywacja partenogenetyczna

Typy reakcji oocytów na stymulację partenogenetyczną:

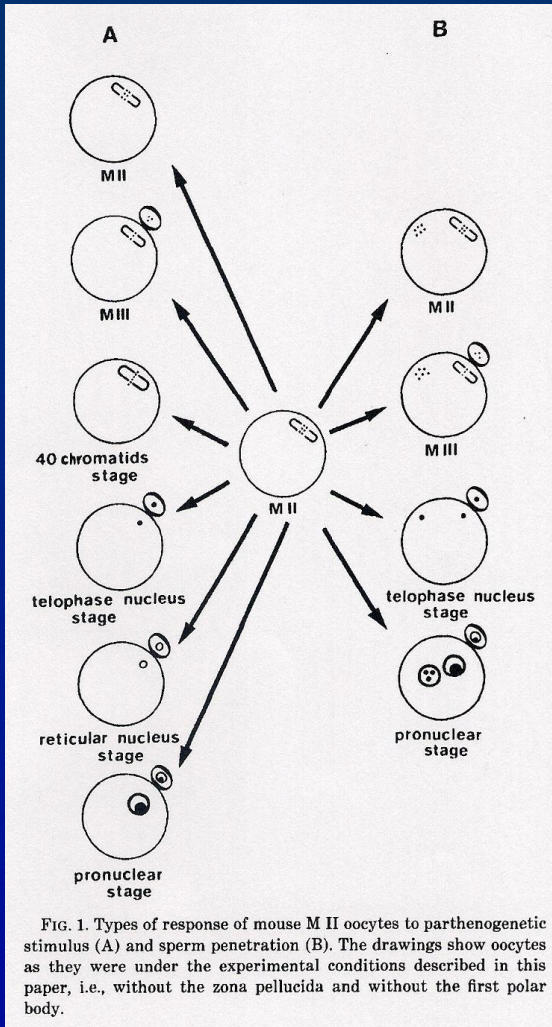
- MII (brak reakcji)
- MIII (przejdzie do kolejnej metafazy; wyrzucenie II c.k.)
- Stadium 40-chromatydowe
- telophase nucleus stage
- reticular nucleus stage
- pronuclear stage



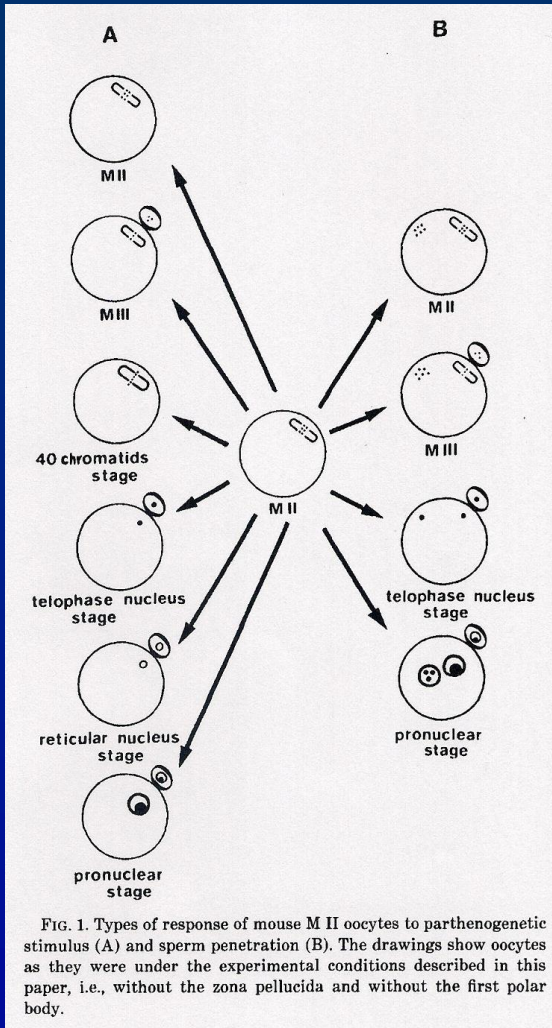
Aktywacja partenogenetyczna

Typy reakcji oocytów na stymulację partenogenetyczną:

- MII (brak reakcji)
- MIII (przejdzie do kolejnej metafazy; wyrzucenie II c.k.)
- Stadium 40-chromatydowe
- Stadium jądra telofazowego



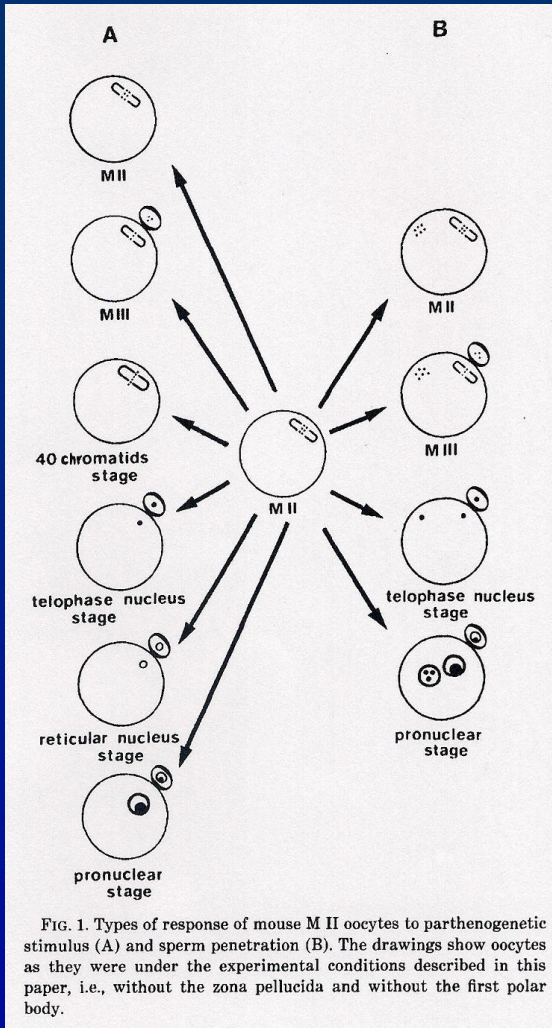
Aktywacja partenogenetyczna



Typy reakcji oocytów na stymulację partenogenetyczną:

- MII (brak reakcji)
- MIII (przejdzie do kolejnej metafazy; wyrzucenie II c.k.)
- Stadium 40-chromatydowe
- Stadium jądra telofazowego
- Stadium jądra retikularnego

Aktywacja partenogenetyczna



Typy reakcji oocytów na stymulację partenogenetyczną:

- MII (brak reakcji)
- MIII (przejdzie do kolejnej metafazy; wyrzucenie II c.k.)
- Stadium 40-chromatydowe
- Stadium jądra telofazowego
- Stadium jądra retikularnego
- Stadium przedjądrza** (przejdzie do interfazy)

Aktywacja partenogenetyczna

TABLE 1
TYPES OF RESPONSE OF MOUSE OOCYTES TO A PARTHENOGENETIC STIMULUS (8% ETHANOL) APPLIED AT VARIOUS TIMES
AFTER HCG INJECTION OF THE MOUSE DONOR

Age of oocytes (hr after HCG injection)	Types of reaction (%)						Total number of oocytes
	M II	40-chromatids stage	M III	Telophase nucleus stage	Reticular nucleus stage	Pronuclear stage	
11	57.6	1.7	35.6	1.7	—	3.4	59
13	3.6	1.3	48.2	1.3	—	45.6	224
16	1.9	—	7.6	13.3	7.7	69.5	105
17.5	—	1.8	3.5	5.4	1.8	87.5	56
21.5	—	—	—	—	—	100	91

Zdolność oocytów MII do normalnej aktywacji jest osiągnięta stopniowo:

- Początkowo nie reagują (pozostają w MII)
- Później są zdolne ukończyć II podział mejozy i wyrzucić II c.k. ale nie tworzą przedjądzy
- Ostatecznie są w stanie ukończyć podział i przejść do interfazy

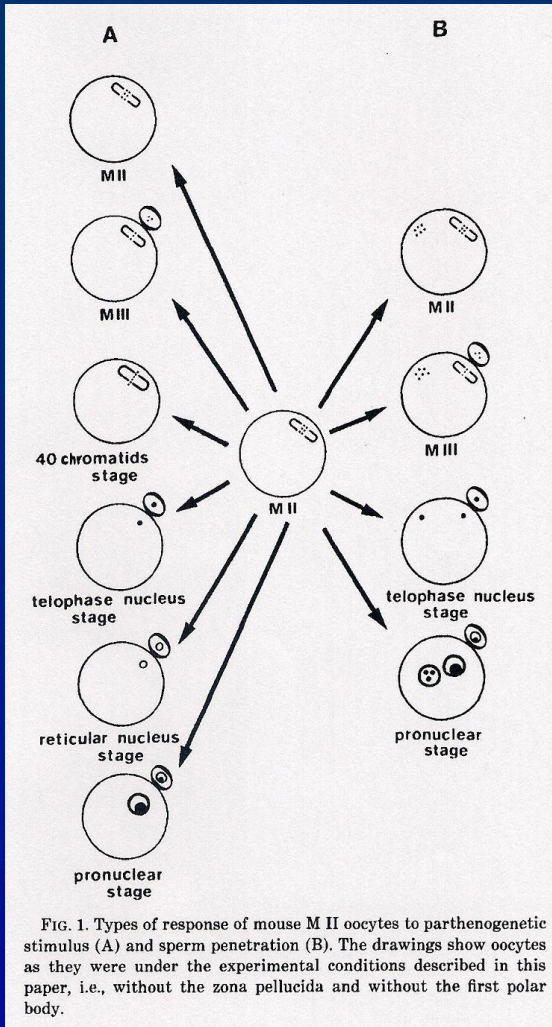
Zapłodnienie *in vitro*

- Oocyty zapładniane między 13 a 17 godz. po zastrzyku z HCG tworzą przedjądrza
- Doświadczenie przeprowadzono więc pomiędzy 11 a 13 godz. od podania HCG

Zapłodnienie *in vitro*

Typy reakcji oocytów na zapłodnienie:

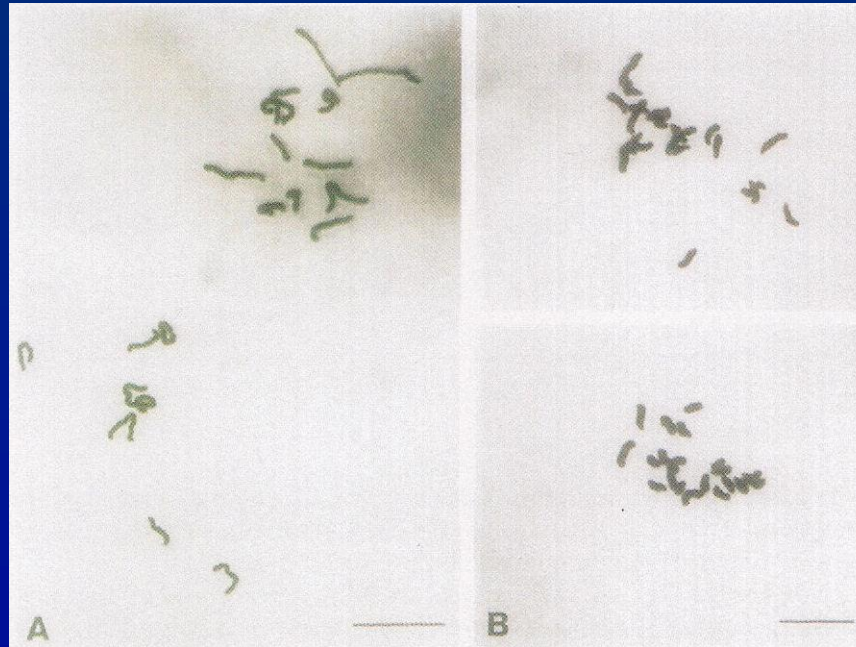
- MII (brak reakcji)
- MIII (przejdzie do kolejnej metafazy; wyrzucenie II c.k.)
- Stadium jądra telofazowego
- Stadium przedjądra (przejdzie do interfazy)



Zapłodnienie *in vitro*

Zachowanie jądra plemnika zależy od typu reakcji oocytu:

- Oocyt w stadium MII lub MIII → jądro plemnika przechodzi dekondensację, następnie rekondensację a później tworzy wyraźne chromosomy



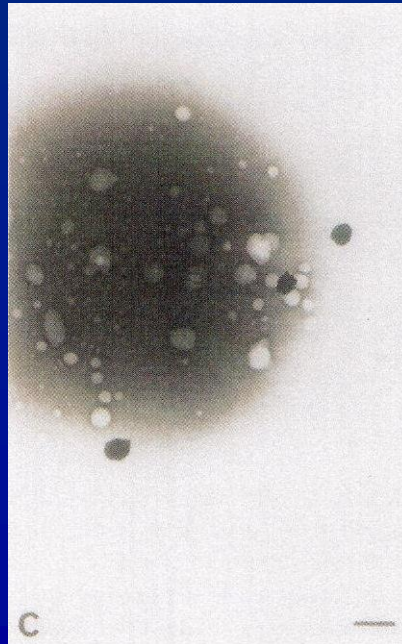
6 godz. po zapłodnieniu

8 godz. po zapłodnieniu

Zapłodnienie *in vitro*

Zachowanie jądra plemnika zależy od typu reakcji oocytu:

- Oocyt w stadium MII lub MII → jądro plemnika przechodzi dekondensację, następnie rekondensację a później tworzy wyraźne chromosomy
- Oocyt w stadium jądra telofazowego → jądro plemnika tworzy gęstą grudkę chromatyny



Zapłodnienie *in vitro*

TABLE 2
TYPES OF RESPONSE OF MOUSE OOCYTES TO FERTILIZATION *IN VITRO*
AT VARIOUS TIMES AFTER HCG INJECTION

Age of oocytes (hr after HCG injection)	Types of reaction (%)			Total number of oocytes	
	M II	M III	Telophase nucleus stage		
			Pronuclear stage		
Monospermy					
11	15.6	18.8	—	65.6	32
12	—	6.9	6.9	86.2	29
13	—	—	—	100	35
Dispermy					
11	5.9	11.8	—	82.3	17
12	—	—	—	100	4
13	—	—	—	100	22

Polispermia:

- Spośród 57 oocytów wszystkie oprócz jednego przeszły do interfazy
- Przy wnikięciu 3-4 plemników powstawały powiększające się przedjądra
- Przy wnikięciu 5 i więcej plemników powstawało tylko jedno przedjądro (prawdopodobnie żeńskie), a jądra plemników zostały zablokowane w rozwoju

Zapłodnienie *in vitro*

- Rodzaj reakcji oocyty zależy zarówno od czasu podania HCG (wieku oocyty) jak i liczby wnikiętych plemników
- Typ reakcji oocyty zależy od rodzaju oraz „siły” bodźca stymulującego do aktywacji
 - polispermia ma silniejszy efekt niż monospermia
 - wnikięcie jednego plemnika jest bardziej skuteczne niż zadziałanie bodźcem partenogenetycznym (8% etanol)

Oocyty MIII

- Powstają gdy oocyty MII są w stanie wznowić ruch anafazowy i wyrzucić II c.k. lecz nie są w stanie przejść do interfazy
- Cechą charakterystyczną stadium MIII jest łatwe odpadanie II c.k. 2-3 godz. od jego wyrzucenia

Oocyty MIII

Doświadczenia badające naturę bloku MIII:

1. ponowne traktowanie oocytów MIII etanolem (2,5-4 godz. po pierwszym razie) → 3 spośród 43 oocytów MIII wyrzuciło III c.k. (2 uformowały przedjądrza, a trzeci wszedł w MIV), pozostałe pozostały w MIII
2. 50 oocytów MII (potraktowanych etanolem 14 godzin po zastrzyku z HCG), 5 godz. później poddano ponownie działaniu etanolu → 78% pozostało w MII, pozostałe przeszły do MIII (8%), utworzyły retikularne (2%), telofazowe (6%) jądra lub normalne przedjądrza (6%)

kontrola: Spośród 51 oocytów (19 godz. od zastrzyku z HCG) traktowanych po raz pierwszy etanolem, większość (88,4%) utworzyła przedjądrza.

Oocyty MIII

Doświadczenia badające naturę bloku MIII:

3. hodowla oocytów MIII w pożywce z puromycyną → prawie wszystkie utworzyły przedjądrza (jeden pozostał w MIII)
4. zapłodnienie *in vitro* oocytów MIII (traktowanych 4-5 godz. wcześniej etanolem) → we wszystkich zapłodnionych oocytach nastąpiło wyrzucenie III c.k., a jądra plemników przeszły dekondensację i przekształciły się w przedjądrza.

4 zapłodnione oocyty hodowano przez noc w obecności kolcemidu → w 3 przypadkach nastąpił rozpad przedjądrzy ujawniając 2 grupy chromosomów: jedną 20 chromosomową (męską) oraz jedną mocno aneuploidalną: 7,8 lub 9 chromosomów (żeńską)



Oocyty MIII

Doświadczenia badające naturę bloku MIII:

3. hodowla oocytów MIII w pożywce z puromycyną → prawie wszystkie utworzyły przedjądrza (jeden pozostał w MIII)
4. zapłodnienie *in vitro* oocytów MIII (traktowanych 4-5 godz. wcześniej etanolem) → we wszystkich zapłodnionych oocytach nastąpiło wyrzucenie III c.k., a jądra plemników przeszły dekondensację i przekształciły się w przedjądrza.

4 zapłodnione oocyty hodowano przez noc w obecności kolcemidu → w 3 przypadkach nastąpił rozpad przedjądrza ujawniając 2 grupy chromosomów: jedną 20 chromosomową (męską) oraz jedną mocno aneuploidalną: 7,8 lub 9 chromosomów (żeńską)

Blok MIII jest bardzo podobny do bloku MII: może zostać przerwany przez wniknięcie plemnika bądź inhibicję syntezy białek.

Aktywacja oocytów MIII skutkuje ruchem anafazowym jednochromatydowych chromosomów i wyrzuceniem III c.k.

Wnioski

- Zdolność oocytów do aktywacji rozwija się stopniowo podczas bloku MII
- Czas w którym oocyty są zdolne do pełnej aktywacji jest różny dla różnych bodźców (oocyty w 13 godz. są w pełni zdolne do aktywacji przez plemnik, w przeciwieństwie do działania etanolem)
- Ruch anafazowy i przejście do interfazy to 2 niezależne procesy: oocyty MIII powstają gdy w oocytach MII zachodzi ruch anafazowy ale brak jest przejścia do interfazy; w obecności kolcemidu oocyty MII są w stanie przejść do interfazy
- Blok MIII jest podobny do bloku MII
- Mechanizm III podziału nie jest typowy: rozdziałowo ulegają jednochromatydowe chromosomy