QUANTIFIED ANALYSIS OF CORTICAL GRANULE DISTRIBUTION OF PORCINE OOCYTES BEFORE MATURATION

KVANTITATIVNÍ ANALÝZA DISTRIBUCE KORTIKÁLNÍCH GRANUL U NEZRALÝCH PRASEČÍCH OOCYTŮ

Hanuláková Š.[1], Milakovič I.[1], Ješeta M.[2], Hanzalová K.[2], Knitlová D.[2], Blahová E.[1], Máchal L.[1]

[1]Department of Animal Breeding, Faculty of Agronomy, Mendel University in Brno, Zemědělská 1/1665, 613 00 Brno, Czech Republic

[2]Department of Genetics and Reproduction,Veterinary Research Institute, Hudcova 296/70, 621 00 Brno, Czech Republic

E-mail: sarka.hanulakova@mendelu.cz

ABSTRACT

Polyspermic penetration i sone of the major problems influence in vitro embryo production. Study of the changes in the cortical granule (CG) population in oocytes is indispensable for understending the mechanism of how oocytes block polyspermic penetration and for developing optimum conditions for in vitro maturation and in vitro embryo production. The effect of follicle size and the effect of estrous cycle phase on the lokalization of cortical granules in pig oocytes was studied. A total of 185 oocytes collected from small or medium follicles in the early, middle and late luteal and the early follicular phase were used. For cortical granules staining were used fluorescein isothiocyanate (FITC)–labelled PNA (Sigma). The movement of cortical granules were assessed with laser confocal microscope and NIS Elements AR 3.00 software. The index of CG distribution (I_{dkg}) was formationed. The Index of CG distribution represents ratio between average signal (FITC) intenzity in peripheral part of oocyte and average intenzity signal (FITC) in central part of oocyte. Data were related to the follicle size, with regard to the phase. Regardless of the follicle size the index of CG distribution was significantly ($P<0.01$) higher (2.22 ± 0.49) for the medium follicle – derived oocytes than for the small follicle – derived oocyte (1.48 ± 0.31). With regard to the phase, in the small follicle – derived oocytes, the CG density index increased significantly ($P<0.01$) from the early luteal (1.2 ± 0.4) to the early follicular (1.7 ± 0.4) phase. With regard to the phase, in the medium follicle – derived oocytes no differences were found. It can be concluded that greater meiotic competence of porcine oocytes influences distribution of cortical granules to the peripheral part of oocytes.

Key words: pig oocytes, cortical granules, PNA, meiotic competence

Acknowledgments: This study was supported by IGA TP 1/2012 and NAZV QI101A166.

ÚVOD

Během folikulogeneze dochází u oocytů k postupnému získávání meiotické a vývojové kompetence. Tato kompetence dává oocytům schopnost zrání a úspěšné fertilizace (Machatkova *et al*., 2004; 2008). V závislosti na velikosti folikulů a fázi estrálního cyklu se prasečí oocyty s různou meiotickou kompetencí výrazně liší v efektivitě in vitro fertilizace (Hulinska *et al*., 2011). Jedním z největších problémů ovlivňujících in vitro produkci embryí je polyspermická penetrace, která ve značné míře ovlivňuje úspěšnou in vitro produkci prasečích embryí (Yoshida *et al*., 1993; Wang *et al*., 1997; Li *et al*., 2003). Nejvyšší podíl polyspermie vykazují oocyty získané z malých folikulů v časné a střední luteální fázi. Oocyty získané ze středních folikulů, v pozdní luteální a časné folikulární fázi, vykazují pouze malý podíl polyspermie (Hulinska *et al*., 2011). Důležitou roli v zablokování polyspermické penetrace hrají kortikální granula (Tahara a Tasaka, 2006; Liu, 2011). Kortikální granula jsou membránové sekretorické organely, které jsou přítomny pouze v nefertilizovaných oocytech, a po vypuštění svého obsahu nejsou nikdy obnoveny (Wang *et al*., 1997; Liu, 2011). Funkcí kortikálních granul je modifikace zóny pellucidy do formy bariéry neprostupné pro spermie – tzv. zona hardenining (Romar *et al*., 2005; Tahara a Tasaka, 2006; Coy *et al*., 2008). Tato bariéra zabrání penetraci přebytečných spermií zvýšením rezistence zóny pellucidy proti proteolytickému štěpení. Porozumění mechanismu přesunu kortikálních granul u prasečích oocytů je důležité pro redukci výskytu polyspermicky penetrovaných oocytů, a pro zdokonalení metod in vitro produkce prasečích embryí. Cílem tohoto experimentu bylo sledování vlivu folikulogeneze na lokalizaci kortikálních granul v cytoplazmě prasečích oocytů.

MATERIÁL A METODIKA

Izolace oocytů

K experimentu bylo použito 185 oocytů získaných z malých (2 – 4 mm) a středních (5 – 9 mm) folikulů. Prasnice byly poraženy na experimentálních jatkách v časné (1-5 den cyklu), střední (6-10 den cyklu) a pozdní (11-14 den cyklu) luteální fáz a časné (15-16 den cyklu) folikulární fázi. K pokusu byla použita pouze ovária s odpovídajícím morfologickým statusem. Oocyty byly izolovány dvěma způsoby. Nejdříve byly aspirací získány oocyty ze středně velkých folikulů a následně byly totální disekcí korové vrstvy získány oocyty z malých folikulů. Oocyty z velkých folikulů (≥ 10 mm) nebyly do pokusu zahrnuty. K experimentu byly použity pouze oocyty s kompaktním zdravým kumulem čítajícím nejméně dvě vrstvy kumulárních buněk a tmavou nebo lehce granulovanou cytoplasmou.

Barvení kortikálních granul

K barvení kortikálních granul byla použita metoda popsaná v práci Yoshidy et al. (1993) s několika úpravami dle Wanga et al. (1997). Po odstranění kumulárních buněk, za pomoci vertexu, byly oocyty fixovány 3,7% paraformaldehydem po dobu 60 minut při pokojové teplotě. Po fixaci následovalo promytí v PBS obsahujícím 0,4 % BSA (Sigma) po dobu 3krát 10 minut. Po promytí byly oocyty permeabilizovány 1% Tritonem X-100 (Sigma) v PBS po dobu 60 minut. Po permeabilizaci byly oocyty promyty v PBS obsahujícím 0,4 % BSA 3krát 10 minut. Po vyjmutí z proplachovacího média byly oocyty barveny pomocí 10 µg/ml fluorescein isothiocyanate (FITC) konjugovaného s peanut aglutininem - PNA (Sigma) v PBS po dobu 30 minut ve tmě. Po obarvení byly oocyty propláchnuty v proplachovacím médiu (PBS + 0,4 % BSA) 3krát 10 minut. Chromatin byl obarven pomocí fluorescenční barvy sytox orange (Invitrogen).

Hodnocení distribuce kortikálních granul

K vizualizaci obarvených kortikálních granul byl použit laserový konfokální mikroskop Leica SP 2. Optický řez byl hodnocen za pomoci softwaru NIS Elements AR 3.00. Za pomoci analýzy obrazu bylo vyhodnoceno zastoupení kortikálních granul v centrální a periferní části. Během analýzy byla plocha optického řezu rozdělena na dvě oblasti. První, se nacházela na periferii těsně pod cytoplazmatickou membránou a představovala 20 % plochy. Zbylá část optického řezu byla nazvána jako centrální část a zaujímala 80 % plochy řezu. Podílem průměrné intenzity signálu, získaného z periferní části a signálu získaného z centrální části, byl vypočítán index distribuce kortikálních granul (I_{dkg}), který vypovídá o přesunu kortikálních granul z centrální do periferní části.

$$I_{dkg} = \frac{\text{průměrná intenzita signálu (FITC) v periferní části } \left(\frac{\text{suma intenzity}}{\text{plocha}}\right)}{\text{průměrná intenzita signálu (FITC) v centrální části } \left(\frac{\text{suma intenzity}}{\text{plocha}}\right)}$$

Statistické vyhodnocení

Získané údaje byly vyhodnoceny pomocí statistického programu Statistica 9.0. K určení rozdílu mezi jednotlivými skupinami byla použita jednofaktorová ANOVA pro hladinu významnosti $P<0,05$ a $P<0,01$.

VÝSLEDKY A DISKUZE

Oocyty s odlišnou meiotickou kompetencí, které byly získány z malých a středních folikulů, v časné luteální až časné folikulární fázi estrálního cyklu, vykazovaly rozdíly v lokalizaci kortikálních granulí v cytoplazmě prasečích oocytů. Získané indexy distribuce kortikálních granul byly porovnány s ohledem na velikost folikulů, ze kterých byly oocyty izolovány, a rovněž s ohledem na fázi estrálního cyklu.

Efekt velikosti folikulu

Velikost indexu distribuce kortikálních granul (I_{dkg}), u oocytů získaných z malých a středních folikulů, bez ohledu na fázi estrálního cyklu, je zobrazena v Tabulce 1. U Oocytů s vyšší meiotickou kompetencí, které byly získány ze středních folikulů, byl zjištěn statisticky vysoce průkazný rozdíl (P<0,01) ve velikosti indexu distribuce kortikálních granul, ve srovnání s oocyty s nižší meiotickou kompetencí získaných z malých folikulů. Jak ukazuje index distribuce kortikálních granul (1,48 ± 0,31), kortikální granula jsou v cytoplazmě oocytů získaných z malých folikulů lokalizovány v centrální části oocytu. Naproti tomu u oocytů s vyšší meiotickou kompetencí byla zjištěna na periferii více než dvakrát vyšší koncentrace kortikálních granul (2,22 ± 0,49) než v centrální oblasti. Index distribuce kortikálních granul u oocytů s vyšší meiotickou kompetencí, které byly získány ze středních folikulů (2,22 ± 0,49)

Tab1: Distribuce kortikálních granul u oocytů získaných z různě velkých folikulů

Velikost folikulů	*n*	*Index distribuce kortikálních granul (I_{dkg})*	
		X	S_x
Malé	134	1,48[a]	0,31
Velké	51	2,22[b]	0,49

a,b – označují statisticky průkazný rozdíl na hladině významnosti P<0,01

Efekt velikosti folikulu a fáze estrálního cyklu

Výsledné hodnoty indexu distribuce kortikálních granul, u oocytů získaných z různě velkých folikulů, s ohledem na fázi estrálního cyklu, jsou prezentovány v Tabulce 2. Index distribuce kortikálních granul, byl u oocytů získaných z malých folikulů v časné luteální fázi (1,2 ± 0,4), statisticky průkazně nižší (P<0,01), než u oocytů získaných z malých folikulů v pozdní luteální fázi, a u oocytů získaných ze středních folikulů v pozdní luteální (2,0 ± 0,7) a časné folikulární fázi (2,4 ± 0,6). Oocyty získané z malých folikulů, ve střední luteální fázi, měly statisticky průkazně nižší (P<0,01) hodnotu indexu kortikálních granul (1,4 ± 0,5), než vykázaly oocyty, získané ze středních folikulů v pozdní luteální a časné folikulární fázi. U oocytů získaných z malých folikulů v pozdní luteální fázi, byl zjištěn statisticky průkazný rozdíl (P<0,01) v hodnotě I_{dkg} , ve srovnání s hodnotou indexu u oocytů získaných z malých folikulů v časné luteální fázi (1,22 ± 0,4), a u oocytů získaných ze středních folikulů v časné folikulární fázi (2,4 ± 0,6). Oocyty získané z malých folikulů v časné folikulární fázi, měly statisticky průkazně nižší hodnotu indexu distribuce kortikálních granul (1,7 ± 0,4) pouze ve srovnání s oocyty, získanými ze středních folikulů v časné folikulární fázi (2,4 ± 0,6). Index distribuce kortikálních granul u oocytů izolovaných ze středních folikulů v pozdní luteální fázi (2,0 ± 0,7), vykázal statisticky průkazně vyšší hodnotu (P< 0,01) ve srovnání s oocyty izolovanými z malých folikulů v časné a střední luteální fázi. U oocytů izolovaných ze středních folikulů v časné folikulární fázi, byla nalezena statisticky průkazně vyšší

(P<0,01) hodnota indexu distribuce kortikálních granul (2,4 ± 0,6), ve srovnání s oocyty izolovanými z malých folikulů v časné, střední a pozdní luteální, a časné folikulární fázi.

Tab 2: Distribuce kortikálních granul u oocytů získaných z různě velkých folikulů s ohledem na fázi estrálního cyklu

Velikost folikulů	*Fáze*	*Stádium*	*n*	*Index distribuce kortikálních granul (I_{dkg})*	
				X	S_x
	Luteální	*časná*	51	$1,2^{a}$	0,4
Malé		*střední*	36	$1,4^{ac}$	0,5
		pozdní	31	$1,8^{cd}$	0,7
	Folikulární	*časná*	16	$1,7^{acd}$	0,4
	Luteální	*pozdní*	22	$2,0^{bd}$	0,7
Střední	*Folikulární*	*časná*	29	$2,4^{b}$	0,6

a,b,c,d – označují statisticky průkazný rozdíl na hladině významnosti P<0,01

DISKUZE

Migrace kortikálních granul v cytoplazmě, je u savčích oocytů obecně známou skutečností, a to nejen v podmínkách in vivo, ale také v podmínkách in vitro (Coy a Avilés, 2010; Gulyas, 1980). Porozumění mechanismu přesunu kortikálních granul u prasečích oocytů může přispět k redukci výskytu polyspermicky penetrovaných oocytů, a ke zdokonalení metod in vitro produkce prasečích embryí. Hlavním zdrojem prasečích embryí jsou oocyty získané z ovárií prepubertálních prasniček, přestože tyto oocyty vykazují nízkou meiotickou a vývojovou kompetenci (Hyun et al., 2003; Ikeda a Takahashi, 2003; Gupta et al., 2008).

Výsledky tohoto experimentu ukazují změny v distribuci kortikálních granul v cytoplazmě prasečích oocytů v závislosti na fázi estrálního cyklu. Z výsledků je patrné, že u oocytů s nízkou meiotickou kompetencí, které byly získány z malých folikulů, jsou kortikální granula lokalizována homogenně v celé cytoplazmě oocytu a koncentrace kortikálních granul na periferii je jen nepatrně vyšší, než v ostatních oblastech oocytu. U oocytů s vyšší meiotickou kompetencí, které byly získány ze středních folikulů, jsou kortikální granula lokalizována především v periferní části. Výsledky tedy poukazují na to, že s postupným získáváním meiotické kompetence dochází k migraci kortikálních granul cytoplazmou oocytu směrem k jeho periferní části. Hulinská et al. (2011) ve své práci uvádí, že nejvyšší podíl polyspermie vykazují oocyty s nízkou meiotickou kompetencí, získané z malých folikulů, v časné (71,8 ± 4,6 %) a střední luteální fázi (60,9 ± 5,9 %). Naopak oocyty získané ze středních folikulů, v pozdní luteální (34,9 ± 2,9 %) a časné folikulární fázi (33,3 ± 3,4 %), vykazují pouze malý podíl polyspermie.

V předchozích experimentech bylo zjištěno, že u nezralých oocytů jsou kortikální granula homogenně rozmístěna v cytoplazmě oocytu a teprve po procesu maturace dojde k přesunu kortikálních granul k periferii a k postupnému vytvoření souvislé vrstvy kortikálních granul pod cytoplazmatickou membránou (Wang et al., 1997; Sawamukai et al., 1998; Coy et al., 2002). Tyto experimenty byly realizovány bez ohledu na fázi pohlavního cyklu poražených zvířat. Předkládaná studie je první práce zaměřená na lokalizaci kortikálních granul nezralých oocytů izolovaných v různé fázi folikulogeneze. Prezentované výsledky naznačují, že existují rozdíly mezi oocyty izolovanými z různě velkých folikulů v průběhu ovariálního cyklu. Lokalizace kortikálních granul, tak může být jedním z parametrů cytoplazmatické zralosti oocytů. Nedostatečná distribuce kortikálních granul již na počátku meiotického zrání, může významně ovlivnit efektivitu polyspermického bloku a mohla být jednou z příčin vysoké polyspermie při fertilizaci oocytů izolovaných v časné a střední luteální fázi (Hulinská et al., 2011). Efektivní využití této znalosti by mohlo zlepšit metody in vitro fertilizace prasat. Je však zapotřebí, ověřit zjištěné informace pomocí experimentů využívajících in vitro fertilizaci.

ZÁVĚR

Závěry našeho výzkumu ukazují, že se prasečí oocyty s rozdílnou meiotickou kompetencí liší v cytoplazmatické zralosti, a tím i ve schopnosti distribuce kortikálních granul k periferní části oocytu již na počátku meiotického zrání.

LITERATURA

Coy P., Gadea J., Romar R., Matás C., García E. (2002): The eefect of in vitro fertilization medium on the acrosome reaction, cortical reaction, zona pellucida hardening, and in vitro development in the pig. Reproduction, 124: 279-288

Coy P., Grullón L., Cánovas S., Romar R., Matás C., Avilés M. (2008): Hardening of the zona pellucida of unfertilized eggs can reduce polyspermic fertilization in the pig and cow. Reproduction, 135: 19-27

Coy P., Avilés M. (2010):What Controls polyspermy in mammals, the oviduct or the oocyte?. Biological Reviews, 85: 593-605

Hulinska P., Martecikova S., Jeseta M., Machatkova M. (2011): Efficiency of in vitro fertilization is influenced by the meiotic competence of porcine oocytes and time of their maturation. Animal Reproduction Science, 124: 112-117

Gulayas BJ. (1980):Cortical granules of mammalian eggs. Int Rev Cytol, 63: 357-392

Gupta MK., Uhm SJ., Lee HT. (2008): Sexual maturity and reproductive phase of oocyte donor influence the developmental ability and apoptosis of cloned and parthenogenetic porcine embryos. Animal Reproduction Science, 108: 107-121

Hyun SH., Lee GS., Kim DY., Kim HS., Lee SH., Kim S., Lee ES., Lim JM., Kang SK., Lee BC., Hwang WS. (2003): Effect of maturation media and oocytes derived from sows or gilts on the development of cloned pig embryos. Theriogenology, 59: 1641-1649

Li Y., Ma W., Li M., Hou Y., Jiao L., Wang W. (2003):Reduced Polyspermic Penetration in Porcine Oocytes Inseminated in New In Vitro Fertilization (IVF) System: Straw IVF. Biology of Reproduction, 69: 1580-1585

Liu M. (2011):The biology and dynamics of mammalian cortical granules. Liu Reproductive Biology and Endocrinology, 9: 149

Machatkova M., Krausova K., Jokesova E., Tomanek M. (2004): Developmental competence of bovine oocytes: effects of follicle size and the phase of follicular wave on in vitro embryo production. Theriogenology, 61: 329-335

Machatkova M., Hulinska P., Horakova J., Reckova Z., Hanzalova K. (2008): Oestrous cycle stage influences the morphology and maturation of porcine oocytes in vitro. Vet. Med., 53: 70-76

Romar R., Coy P., Gadea J., Rath D. (2005):Effect of oviductal and cumulus cells on zona pellucida and cortical granules of porcine oocytes fertilized in vitro with epididymal spermatozoa. Animal Reproduction Science, 85: 287-300

Sawamukai K., Suzuki K., Ogawa H., Shimizu H., Mori T. (1998): Distribution of Cortical Granules in Porcine Oocytes Inseminated In Vitro at Various Times of Culture for Maturation In Vitro. J. Mamm. Ova Res., 15: 139-145

Tahara M., Tasaka K. (2006):Mechanism and Control of Mammalian Cortical Granule Exocytosis. J. Mamm. Ova Res., 23: 10-20

Wang W., Sun Q., Hosoe M., Shioya Y., Day BN. (1997):Quantified Analysis of Cortical Granule Distribution and Exocytosis of Porcine Oocytes during Meiotic Maturation and Activation. Biology of Reproduction, 56: 1376-1382

Ikeda K., Takahashi Y. (2003):Comparison of maturational and developmental parameters of oocytes recovered from prepubertal and adult pigs. Reprod. Fertil. Dev., 15: 215-221

Yoshida M., Cran DG., Pursel VG. (1993):Confocal and fluorescence microscopic study using lectins of the distribution of cortical granules during the maturation and fertilization of pig oocytes. Molecular Reproduction and Development, 36: 462-468