

## НАУКОВІ ОГЛЯДИ

DOI: 10.31393/reports-vnmedical-2018-22(1)-43

УДК: 57:612:636

### НОВІ ДАНІ ЩОДО ДОЗРІВАННЯ ООЦИТІВ ТА ОТРИМАННЯ ЕМБРІОНІВ *IN VITRO*

Сарафінюк Л.А.

Вінницький національний медичний університет ім. М.І. Пирогова (вул. Пирогова, 56, м. Вінниця, Україна, 21018)

Відповідальний за листування:  
e-mail: lsarafinyuk@gmail.com

Статтю отримано 21 грудня 2017 р.; прийнято до друку 19 лютого 2018 р.

**Анотація.** Розглянуто останні наукові успіхи в отриманні ембріонів *in vitro*. Мета роботи - висвітлити нові дані щодо дозрівання ооцитів та отримання ембріонів *in vitro*. Ефективність різних допоміжних методів відтворення можна покращити обробкою гамет та ембріонів сублетальним гідростатичним тиском. Обдирання клітин кумулюсу з ооцита краще проводити через 44 год. від початку процедури дозрівання. Останні 11 год. дозрівання краще проводити у середовищі зі зниженим умістом NaCl. Уміст ліпідів в ооциті значно корелює з кількістю клітин гранульози на фолікул. Більші за розмірами пре- і постпубертатні ооцити характеризуються більшою здатністю до розвитку. Додавкою до середовища культивування гліцину призводить до збільшення у бластоцисті кількості клітин. Додавання фактора росту фібробластів до середовища культивування ооцит-кумулясних комплексів (ОКК) сприяє їх дозріванню та утворенню бластоцист. Нормалізація дозрівання ОКК зменшує поліспермію. Унесення в середовище культивування ОКК васкулярного ендотеліального фактора росту збільшує відсоток утворення бластоцист. Різні клітинні процеси потребують різної кількості коливань концентрації іонів кальцію. Температура рідини преовуляторного фолікула може бути показником якості ооцита. 14-денне культивування ОКК, вилучених з ранніх антральних фолікулів, на поліакриламідному гелі, завершується досягненням ооцитами більших розмірів. Удосконалено метод оптичного спостереження за заплідненням. Розроблено метод перевезення морул - бластоцист на далекій відстані. Уведення в середовище культивування ембріонів свині лізофосфатиду сприяє утворенню бластоцист. Висновок: останні літературні дані свідчать про те, що розроблено ряд різних способів покращення дозрівання ооцитів та отримання ембріонів *in vitro*.

**Ключові слова:** ооцит, ембріон, *in vitro*, культивування.

Культивування ембріонів *in vitro* негативно впливає на їх розвиток та якість, що вдалося показати, порівнявши профілі експресії генів з такими, отриманими від *in vivo* ембріонів. Припускають, що отриманий ембріонами стрес змінює метаболічні шляхи, зокрема надовго пригнічує окислювальне фосфорилування та активує гліколіз. А тому ставиться завдання покращити умови культивування [3]. Мета роботи - висвітлити нові дані щодо дозрівання ооцитів та отримання ембріонів *in vitro*. Аналіз зроблено на основі огляду статей та досліджень за 2016-2018 роки, користуючись базою PubMed.

Обдирання клітин кумулюсу з ОКК через 20 год від початку дозрівання збільшувало відсоток дозрілих порівняно з обдиранням через 0 і 44 год. незалежно від того, з фолікулів якого розміру були вилучені ОКК, але відсоток дозрілих ооцитів з морфологічно нормальним веретеном був більшим у випадку обдирання клітин кумулюсу через 44 год. від початку процедури дозрівання [4].

У результаті дослідження ролі інгібіторів раннього мейозу на дозрівання ооцитів свині виявили, що збільшення концентрації цього фактора викликає передчасний його початок, а виключення експресії одного, але не другого, з двох цих інгібіторів викликає його затримку. Виключення експресії другого інгібітора викликає зняття зупинки дозрівання на метафазі-II, що створює можливість для утворення пронуклеусів [6].

Виявлено, що ОКК, які дозрівали 44 год. у середовищі з 61,6 мМ NaCl (редукованим його умістом), або

хоча б лише останні 11 год., характеризувалися більшим умістом редукованого глутатіону порівняно з їх дозріванням у середовищі зі 108,0 мМ NaCl (ізотонічне середовище), що означає покращення цитоплазматичного дозрівання; більше утворювалося бластоцист 75,4-79,0% проти 60,2-85,8%). Ембріони, отримані переносом ядра соматичної клітини в ооцит, що дозрівав останні 11 год. у середовищі зі зниженим умістом NaCl, утворили значно більше бластоцист (53,5% проти 41,48%) [8].

Уважають, що вміст у клітині ліпідів, АТФ та ацетилованих гістонів відображає її енергетичний стан, а енергетичний стан ооцита тісно пов'язаний з його ростом та розвитком. Ріст ооцита супроводжується збільшенням клітин гранульози навколо нього, які постачають йому енергетичні субстрати. Удалося показати, що в ОКК з антральних фолікулів діаметром 3-5 мм уміст ліпідів в ооциті значно корелює з середньою кількістю клітин гранульози на фолікул та клітин кумулюсу на ОКК [13].

Ооцити препубертатних свиней характеризуються малим відсотком дозрівання порівняно з такими статевозрілих. Дозрілі постпубертатні ооцити характеризуються наявністю метафазі-II; відсутністю контакту між ооцитом та клітинами кумулюсу; відсутністю грубого ендоплазматичного ретикулуму та комплексів Гольджі; периферичною локалізацією кортикальних гранул; центральною локалізацією мітохондрій; везикулами; ліпідними краплями. Препубертатні ооцити характеризуються більшою варіативністю.

Більші пре- і постпубертатні ооцити характеризуються більшою здатністю до розвитку. Не знайдено різниці в густині мітохондрій в ооцитах різних груп [15].

Більшість умов культивування *in vitro* не досягають оптимальності для розвитку ембріонів. Про це свідчить різниця в експресії генів бластоцист, отриманих *in vitro* та *in vivo*. Додавання до середовища культивування 10 мМ гліцину призводить до збільшення у бластоцисті загальної кількості клітин. Але, мітохондріальна активність клітин бластоцисти, кількість копій мітохондріальної ДНК та транскриптів з них не змінилися порівняно з контролем. Незважаючи на покращення якості бластоцист від додавання гліцину в середовище культивування, їх трансплантація не завершилася народженням поросят, у той час як трансплантація контрольних завершилася успіхом [16].

Фактор росту фібробластів 10 є регулятором дозрівання ОКК. Відсоток ОКК, що розрослися повністю, а ооцити досягли стадії метафази-II, у середовищі з 10 нг/мл цього фактора росту був значно більшим, ніж у контролі. Відсоток дроблення, утворення бластоцист та кількості клітин у них були значно більшими у середовищі з 10 та 50 нг/мл цього фактора [19].

Якщо ооцит ссавця дозріває нормально, він здатний допустити до запліднення лише один спермій та трансформується у доімплантаційний ембріон. Дозрівання ОКК супроводжується безперервними біохімічними та молекулярними змінами. Це вказує на те, що експресія генів у незрілому та зрілому ооцитах сильно відрізняється. Дослідження показали суттєву активацію генів, пов'язаних з морфологією ооцитів, клітинною міграцією та адгезією, міжклітинними взаємодіями, реорганізацією мікротрубочок, проліферацією, диференціацією. Припускають, що більшість генів морфогенезу ооцита можуть бути причетними до його дозрівання [1].

Як результат культивування ОКК *in vitro*, відсоток дозрілих ооцитів більший у тому випадку, коли їх вилучають з фолікулів середнього розміру (3-6 мм в діаметрі) порівняно з випадком, коли їх вилучають із малих фолікулів (0,5-3 мм в діаметрі). Концентрація васкулярного ендотеліального фактора росту була більшою в середовищі культивування ОКК з фолікулів середнього розміру, а тому, коли ОКК з фолікулів малого розміру культивували в середовищі з підвищеною концентрацією цього фактора росту (200 нг/мл) протягом перших 20 год. дозрівання, значно збільшився відсоток дозрівання ооцитів та утворення з них бластоцист після партеногенетичної активації [2].

Загальновідомо, що активація ооцита залежить від іонів кальцію. Згідно зі стандартною моделлю перетворення сигналу, іони кальцію управляють мейотичним перетворенням ядра ооцита в результаті запліднення організму усіх видів, що їх вивчали дотепер. Але, виявилось, що зміни концентрації іонів кальцію під час активації ооцита є видозалежними. В одних видів (наприклад у амфібій) має місце лише одне коливання її вели-

чини, а в інших (у ссавців) - більше, - осциляція. І тим не менше, для активації ооцита ссавця достатньо лише одного коливання. Та різні клітинні процеси потребують різну кількість коливань концентрації іонів кальцію. Припускають, що важлива не стільки частота осциляції, скільки сумація ефектів кожного коливання [5].

З 1980 року декілька досліджень, з використанням хірургії та анестезії, показали, що температура преовуляторного фолікула нижча за температуру інших тканин яєчника кролиці, корови, свині та людини. Зараз результати тих досліджень знайшли подальше підтвердження шляхом використання лише термісторного зонда, - уведенням його в преовуляторний фолікул [7].

Відомо, що С-фікоціанін, білок із мікроводоростей, характеризується антиоксидантними властивостями та інактивує вільні радикали. Додавання його до середовища дозрівання ооцитів свині *in vitro* не покращило дозрівання їх ядер, але і концентрації 5 мкг/мл значно збільшувало утворення бластоцист та процент виходу їх із прозорої оболонки після партеногенетичної активації. А після уведення спермія в ооцит значно збільшувалася кількість клітин у бластоцисті [10].

Мелатонін характеризується антиоксидантними властивостями, зокрема може захищати гамети та ембріони від пошкодження активними формами кисню. Було виявлено, що доданий до середовища запліднення ооцитів у концентрації 1мМ він не впливає на відсоток пенетрованих, моноспермних та запліднених гамет, дроблення та утворення бластоцист порівняно з контролем. Він не вплинув також на функціональність спермійів, уключаючи цілісність їх плазматичної мембрани та акросоми, та на апоптоз, незважаючи на тривалість інкубування [11].

Головна відмінність між культивуванням фолікулів *in vivo* та *in vitro* - жорсткість субстрату, на якому вони ростуть. Знайдено, що 14-денне культивування ОКК, вилучених з ранніх антральних фолікулів, на поліакриламідному гелі, порівняно без нього, завершується досягненням ооцитами більших розмірів, більшим умістом ліпідів та АТФ, більшою ацетиляцією лізину та більшою здатністю досягати стадії бластоцисти після запліднення [14].

Відомо, що протягом запліднення *in vitro* ооцитів ссавців осциляції концентрації іонів кальцію в них повновлюють їх клітинний цикл та запускають блокування поліспермії. Постало завдання розробити метод оптичного спостереження за зв'язком між цими процесами. Його вирішення дало змогу зареєструвати періодичність осциляцій в ембріонів миші (7-8 протягом перших двох годин) та відмітити, що використання даного методу не затримувало розвитку ембріонів і не шкодило народженню потомства [17].

Ресвератрол і мелатонін характеризуються антиоксидантними властивостями, а тому їх запропонували використовувати для того, щоб посприяти дозріванню ооцитів свині *in vitro*. Комбіноване застосування цих

агентів дозволило отримати значно більше бластоцист і клітин у них після уведення спермія в яйцеклітину. Було зроблено висновок, що ці агенти діють синергічно, покращують дозрівання ядра ооцита та сприяють розвитку ембріонів [9].

З метою досягнення більшої зручності в утриманні ембріонів *in vitro* розробили спеціальні умови їх зберігання, які включали в себе середовище NCSU-23, доповнене бичачим сироватковим альбуміном та речовиною хепес, буферні властивості якого дозволили відмовитися від продування середовища вуглекислим газом. Використання цієї стратегії дало можливість перевозити свіжі ембріони (морули - бластоцисти) на далекі відстані без застосування рідкого азоту [12].

Модифікації середовища культивування, включаючи додавання різних факторів, важливі для дозріван-

ня ооцитів та отримання ембріонів *in vitro*. Уведення в середовище культивування ембріонів свині лізофосфатиду (органічна кислота) з четвертого до сьомого дня цього процесу покращує утворення бластоцист і допомагає розвитку доімплантаційних ембріонів, хоча кількість клітин у бластоцистах не збільшувалося [18].

### Висновки та перспективи подальших розробок

1. Останні літературні дані свідчать про те, що розроблено ряд різних нових способів покращення дозрівання ооцитів та отримання ембріонів *in vitro*.

У перспективі розроблені нові способи покращення дозрівання ооцитів та отримання ембріонів *in vitro* дадуть можливість підвищити репродуктивний потенціал тварин та будуть використані в медицині.

### Список посилань - References

- Budna, J., Bryja, A., Celichowski, P., Kahan, R., Kranc, W., Ciesiyika, S. ... Kempisty B. (2017). Genes of cellular components of morphogenesis in porcine oocytes before and after IVM. *Reproduction*, 154 (4), 535-545. DOI: 10.1530/REP-17-0367.
- Bui Thi Tra, M. I., Nguyen, K. X., Karata, A., Ferre, P., Tran, M. T., Wakai, T. & Funahashi, H. (2017). Presence of vascular endothelial growth factor during the first half of IVM improves the meiotic and developmental competence of porcine oocytes from small follicles. In Bui Thi Tra, M. I. (Ed.). *Promoting effects of vascular endothelial Growth factor (vegf) on the competence of Oocytes derived from small follicles*. <http://dx.doi.org/10.1071/RD16321>.
- Cagnone, G. & Sirard, M-A. (2016). The embryonic stress response to in vitro culture: insight from genomic analysis. *Reproduction*, 152 (6), R247-R261. DOI: 10.1530/REP-16-0391.
- Ferre, P., Bui, Tra Mi Thi, Wakai, T. & Funahashi, H. (2016). Effect of removing cumulus cells from porcine cumulus-oocyte complexes derived from small and medium follicles during IVM on the apoptotic status and meiotic progression of the oocytes. *Theriogenology*, 86 (7), 1705-1710. <http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.05.024>.
- Ferrer-Buitrago, M., Bonte, D., De Sutter, P., Leybaer, L. & Heindryckx, B. (2017). Single Ca<sup>2+</sup> transients vs oscillatory Ca<sup>2+</sup> signaling for assisted oocyte activation: limitations and benefits. *Reproduction*, 155 (2), R105-R119. DOI: 10.1530/REP-17-0098.
- Fujioka Y. A., Asuka Onuma, Wataru Fujii, Koji Sugiura & Kunihiko, Naito. (2016). Analyses of EMI functions on meiotic maturation of porcine oocytes. *Molecular Reproduction & Development*, 83 (11), 983-992. DOI 10.1002/mrd.22738.
- Hunter, R. H. F., Lopez-Gatiu, F. & Lopez-Albors, O. (2017). Temperature gradients in vivo influence maturing male and female gametes in mammals: evidence from the cow. *Reproduction, Fertility and Development*, 29 (12), 2301-2304. <http://dx.doi.org/10.1071/RD17089>.
- Lee, J., Lee, H., Lee, Y., Park, B., Elahi, F., Seung Tae Lee ... Lee, E. (2016). In vitro oocyte maturation in a medium containing reduced sodium chloride improves the developmental competence of pig oocytes after parthenogenesis and somatic cell nuclear transfer. *Reproduction, Fertility and Development*, 80, 753-762. <http://dx.doi.org/10.1071/RD15488>.
- Lee S. S., Jin, J-X, Taweechaipaisankul, A., Kim, G. A. & Lee, B. C. (2018). Synergistic effects of resveratrol and melatonin on in vitro maturation of porcine oocytes and subsequent embryo development. *Theriogenology*, 114, 191-198. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2018.03.040.
- Liang, S., Guo, J., Jin, Y. X., Yuan, B., Zhang, J-B. & Kim, N-H. (2017). C-Phycocyanin supplementation during in vitro maturation enhances pre-implantation developmental competence of parthenogenetic and cloned embryos in pigs. *Theriogenology*, 106, 69-78. doi: 10.1016/j.theriogenology.2017.09.001.
- Martinez, C. A., Nohalez, A., Cuello, C., Roca, J., Gil, M.A., Martinez, E.A. & Parrilla, I. (2016). Effects of melatonin added to gamete co-incubation medium on sperm functionality and in vitro production of porcine embryos. *Animal Reproduction Science*, 169, 130. <http://dx.doi.org/10.1016/j.anireprosci.2016.03.082>.
- Martinez, C.A., Nohalez, A., Parrilla, I., Lucas, X., Sanchez-Osorio, J., Roca, J. ... Gil, M. A. (2018). Simple storage (CO<sub>2</sub>-free) of porcine morulae for up to three days maintains the in vitro viability and developmental competence. *Theriogenology*, 108, 229-238. doi: 10.1016/j.theriogenology.2017.12.001.
- Munakata, Y., Ichinose, T., Ogawa, K., Itami, N., Tasaki, H., Shirasuna, K. ... lwata, H. (2016). Relationship between the number of cells surrounding oocytes and energy states of oocytes. *Theriogenology*, 86 (7), 1789-1798.e1. doi: 10.1016/j.theriogenology.2016.05.036.
- Munakata, Y., Kawahara-Miki, R., Shirasuna, K., Kuwayama, T. & lwata, H. (2017). Polyacrylamide gel as a culture substrate improves in vitro oocyte growth from porcine early antral follicles. *Mol. Reprod. Dev.* 84 (1), 44-54. DOI 10.1002/mrd.22758.
- Pedersen, H. S., Callesen, H., Llvendahl, P., Chen, F., Nyengaard, J. R., Nikolaisen, N. K. ... Hyttel, P. (2016). Ultrastructure and mitochondrial numbers in pre- and postpubertal pig oocytes. *Reproduction, Fertility and Development*, 28, 586-598. <http://dx.doi.org/10.1071/RD14220>.
- Redel, B. K., Spate, L. D., Lee, K., Mao, J., Whitworth, K. M. & Prather, R. S. (2016). Glycine supplementation in vitro enhances porcine preimplantation embryo cell number and decreases apoptosis but does not lead to live births. *Molecular Reproduction & Development*, 83, 246-258. doi: 10.1002/mrd.22618.
- Satouh, Y., Nozawa, K., Yamagata, K., Fujimoto, T. & Ikawa, M. (2017). Viable offspring after imaging of Ca<sup>2+</sup> oscillations

- and visualization of the cortical reaction in mouse eggs. *Biology of Reproduction*, 96 (3), 563-575. doi:10.1093/biolre/iox002.
18. Min-Young, S., Lee, S.-E., Son, Y.-J., Park, Y.-G., Jeong, S.-G., Kim, E.-Y. & Park, S.-P. Lysophosphatidic acid accelerates development of porcine embryos by activating formation of the blastocoel. (2018). *Mol. Reprod. Dev.*, 85, 62-71. DOI: 10.1002/mrd.22938.
19. Son, Y.-J., Lee, S.-E., Hyun, H., Shin, M.-Y., Park, Y.-G., Jeong, S.-G., & Park, S.-P. (2016). Fibroblast growth factor 10 markedly improves in vitro maturation of porcine cumulus-oocyte complexes. *Molecular Reproduction & Development*, 84 (1), 67-75. DOI: 10.1002/mrd.22756.

**Сарафинюк Л.А.**

#### НОВЫЕ ДАННЫЕ ОТНОСИТЕЛЬНО СОЗРЕВАНИЯ ООЦИТОВ И ПОЛУЧЕНИЯ ЭМБРИОНОВ IN VITRO

**Аннотация.** Рассмотрены последние научные успехи в получении эмбрионов *in vitro*. Цель работы - представить новые данные относительно созревания ооцитов и получения эмбрионов *in vitro*. Эффективность разных вспомогательных методов воспроизведения можно улучшить обработкой гамет и эмбрионов сублетальным гидростатическим давлением. Обдирание клеток кумулюса из ооцита лучше проводить через 44 часа от начала процедуры созревания. Последние 11 часов созревания лучше проводить в среде со сниженным содержанием NaCl. Содержание липидов в ооците значительно коррелирует с количеством клеток гранулёзы на фолликул. Большие по размерам пре- и постпубертатные ооциты характеризуются большей способностью к развитию. Прибавление к среде культивирования глицина приводит к увеличению количества клеток у бластоцист. Добавка фактора роста фибробластов к среде культивирования ОКК содействует их созреванию и образованию бластоцист. Нормализация созревания ОКК уменьшает полиспермию. Внесение в среду культивирования ОКК васкулярного эндотелиального фактора роста увеличивает процент образования бластоцист. Разные клеточные процессы требуют разного количества колебаний концентрации ионов кальция. Температура жидкости преовуляторного фолликула может быть показателем качества ооцита. 14-дневное культивирование ОКК, изъятых из ранних антральных фолликулов, на полиакриламидном геле, завершается достижением ооцитами больших размеров. Усовершенствовано метод оптического наблюдения за оплодотворением. Разработано метод транспортировки морул - бластоцист на дальние расстояния. Введение в среду культивирования эмбрионов свиньи лизофосфатида содействует образованию бластоцист. Вывод: последние литературные данные свидетельствуют о том, что разработано ряд разных способов улучшения созревания ооцитов и получения эмбрионов *in vitro*.

**Ключевые слова:** ооцит, эмбрион, *in vitro*, культивирование.

**Sarafinyuk L.A.**

#### NEW DATA CONCERNING OOCYTE MATURATION AND EMBRYO PRODUCTION IN VITRO

**Annotation.** It is reviewed last science data concerning oocyte maturation and pig embryo production *in vitro*. The aim of the work is to present new data concerning oocyte maturation and embryo production *in vitro*. Efficiency of different assistant reproductive methods can be improved by treatment of gametes and embryos with sublethal hydrostatic pressure. COCs denudation is better to perform 44 hours from the initiation of maturation procedure. Last 11 hours of maturation is better to perform in medium with decreased quantity of NaCl. Lipid content in oocyte significantly correlates with number of granulose cells per follicle. Larger size pre- and post pubertal oocytes are characterized by greater ability to development. Supplementation of culture medium with glycine leads to increase number of blastocyst cells. Addition of fibroblast growth factor to COCs culture medium benefits its development and blastocyst formation. COCs maturation normalization decreases polyspermy. Bringing endothelial growth factor in COCs medium culture increases rate of blastocyst formation. Different cells processes require different quantity of calcium ion oscillations. Temperature of liquid of preovulatory follicle can be indicator for oocyte quality. 14-days culture of COCs, recovered from early antral follicles, on polyacrylamide gel, results in achievement of larger size oocytes. It is improved method for optical observation of fertilization. It is worked out morula - blastocyst transportation for long distances. Introduction of Lysophosphatidic acid accelerates development of porcine embryos by activating formation of the blastocoel. Conclusion: last literature data show that row of different means of improvement for oocyte maturation and obtaining embryo *in vitro* is worked out.

**Keywords:** oocyte, embryo, *in vitro*, culture.