

Charakterystyka wybranych suplementów pożywki do dojrzewania *in vitro* oocytów ssaków

Jolanta Opiela

*Instytut Zootechniki Państwowy Instytut Badawczy,
Dział Biotechnologii Rozrodu Zwierząt, 32-083 Balice k. Krakowa*

Skład pożywki do dojrzewania oocytów determinuje w dużej mierze efektywność pozaustrojowej produkcji zarodków. Obecnie, przy użyciu metod *in vitro*, możliwe jest uzyskanie u bydła około 90% oocytów osiągających dojrzałość jądra, jednakże odsetek zapłodnionych oocytów osiągających w kompleksowym systemie *in vitro* stadium blastocysty, a także odsetek zarodków, które po przeniesieniu do dróg rodnych biorczyń wykazują zdolność do pełnego rozwoju ulega zdecydowanej redukcji i nawet w najbardziej optymalnych warunkach nie przekracza na ogół 40% wyjściowej liczby hodowanych zygot (Kątska-Książkiewicz, 2006). Ten poziom wydajności metody pozaustrojowej produkcji zarodków pozwala wprawdzie na jej praktyczne zastosowanie, jednak doskonalenie warunków dojrzewania oocytów oraz hodowli zarodków leży w sferze zainteresowań zespołów badawczych zajmujących się tą problematyką. Ponadto, jakość dojrzałych *in vitro* oocytów, a także zarodków rozwijających się z tych oocytów po zapłodnieniu *in vitro*, jest zróżnicowana i zdecydowanie obniżona w porównaniu z oocytami i zarodkami uzyskiwanymi w warunkach *in vivo*. Wspomniane różnice dotyczą morfologii, tempa rozwoju, metabolizmu zarodka (np. zawartości wewnątrzkomórkowego glutationu – GSH), ultrastruktury (lokalizacji mitochondriów, rozmieszczenia cytoszkieletu), ekspresji genów, a także podatności na kriokonserwację (Sirard i Coenen, 2006).

W licznych badaniach testowano podatność dodatku do pożywki szeregu związków, takich jak czynniki wzrostu, hormony i inne białka. Spośród wielu dotychczas testowanych

istotne znaczenie przypisuje się insulinopodobnemu czynnikowi wzrostu (IGF-I, ang. insulin-like growth factor I). McElroy i in. (2010) hodowali pozbawione komórek wzgórka jajonośnego oocyty kobiety w obecności m. in. IGF-I i wykazali zwiększone zdolności rozwojowe oocytów, gdyż uzyskali wyższy odsetek rozwijających się partenogenetycznych blastocyst w stosunku do grupy kontrolnej. Zgodnie z najnowszymi doniesieniami, inny czynnik wzrostu – EGF (ang. epidermal growth factor) funkcjonalnie naśladuje FSH i może go bez szkody dla osiąganej dojrzałości mejotycznej zastąpić (Uhm i in., 2010). Najprawdopodobniej FSH indukuje dojrzewanie mejotyczne za pośrednictwem ścieżki przekazywania sygnału zależnej od receptora EGF (EGFR). Ponadto, zastosowanie EGF razem z FSH znacznie polepsza dojrzałość cytoplazmatyczną oocytów świni, co manifestuje się wyższym odsetkiem rozwijających się blastocyst w wyniku zapłodnienia oocytów hodowanych w pożywce uzupełnionej ww. suplementami (Uhm i in., 2010). Czynnik EGF z powodzeniem stosowany jest jako dodatek do pożywki IVM (*in vitro* maturation medium) oocytów różnych gatunków zwierząt, w tym tak egzotycznych, jak małpiatka marmozety lwiej i wielbłąd dwugarbny (Tkachenko i in., 2010; Wani i in., 2010).

Kontrowersyjne są opinie na temat dodatku do pożywki surowicy płodów cielęcych (FCS). W ostatnich latach dąży się do wyeliminowania surowicy krwi (FBS, FCS, ECS) lub jej pochodnych, np. albuminy, jako składnika pożywki do dojrzewania oocytów i hodowli zarodków. Powodem jest niejednoznaczny wpływ su-

rowicy na jakość oocytów i zarodków, zarówno pozytywny, jak i negatywny. Wiadomo, że dodatek surowicy zwiększa odsetek uzyskanych po zapłodnieniu *in vitro* blastocyst, szczególnie w przypadku sub-optimalnych warunków hodowli (Russel i in., 2006). Istnieją również doniesienia na temat szkodliwego wpływu surowicy na rozwój oocytów (Ali i Sirard, 2002) i zarodków (Rizos i in., 2003). Stwierdzono, że FCS zawiera zarówno związki antyapoptotyczne, np. białkowe czynniki wzrostu, jak i proapoptotyczne, np. czynnik martwicy nowotworu α (TNF α , ang. tumor necrosis factor α), który może indukować śmierć komórki. Badania Fouladi-Nashta i in. (2005) nie potwierdziły jednakże tego spostrzeżenia, bowiem wykazano brak różnic w liczbie jąder apoptotycznych w zarodkach hodowanych zarówno w pożywce zawierającej surowicę, jak i bez surowicy. Jak wykazali natomiast Rizos i in. (2003), w zarodkach hodowanych w obecności surowicy nastąpił znaczny wzrost ekspresji białka Bax. Z przedstawionego przeglądu piśmiennictwa wynika zatem, że wpływ surowicy nie jest jednoznacznie określony. Wiadomo też, że surowica zawiera enzymy, hormony czy czynniki wzrostu w zróżnicowanych stężeniach, często odmiennych w kolejnych seriach produktu, co może powodować dużą zmienność warunków hodowli, a więc i efektywność pozaustrojowego uzyskiwania zarodków. Ponadto, stosowanie w pożywkach produktów pochodzenia zwierzęcego, mimo znacznej poprawy sanitarnej w zakresie ich pozyskiwania oraz metod sterylizacji, związane jest z ryzykiem infekcyjnym. W świetle prezentowanych przykładów celowe jest zatem opracowanie pożywki do dojrzewania oocytów, która pozwoliłaby na standaryzację warunków hodowli oraz wyeliminowałaby ryzyko wynikające z obecności surowicy. Podejmowane są próby zastąpienia surowicy syntetycznymi polimerami, takimi jak poliwinylpirolidon (PVP) czy alkohol poliwinylowy (PVA) (Warzych i in., 2007 a, b). Najnowsze badania polskich zespołów podejmujących tę tematykę wykazały jednak, że PVP40 stosowany w zastępstwie surowicy powodował wzrost indeksu apoptotycznego blastocyst uzyskanych z zapłodnienia oocytów dojrzewających w obecności PVP w porównaniu z blastocystami wyprodukowanymi z oocytów dojrzewających w pożywce z białkami zwierzę-

cymi, jak FBS lub beztłuszczowa BSA. Z kolei, badania Chung i in. (2007) wskazują na możliwość zastąpienia surowicy w pożywce do dojrzewania oocytów bydłych polimerem PVP360. Autorzy ci stwierdzili, że oocyty dojrzewające w pożywce z PVP wykazywały podobne zdolności rozwojowe po zapłodnieniu jak oocyty dojrzewające w pożywce z FCS. W poszukiwaniu bardziej efektywnych rozwiązań w hodowli *in vitro* podjęto próby zastosowania substytutów roślinnych. Wykazano już korzystny wpływ zastąpienia surowicy zwierzęcej białkiem roślinnym w pożywkach do hodowli zarodków (Gajda i in., 2007) oraz w pożywkach używanych w pracach z plemnikami ssaków (Bochenek i Smorąg, 2008). Białko roślinne jest znacznie bezpieczniejszym pod względem sanitarnym suplementem w porównaniu do białka zwierzęcego. W aspekcie wykorzystania zarodków, zarówno do celów hodowlanych jak i doświadczalnych, parametr ten jest niezwykle ważny, dlatego możliwość wykluczenia surowicy zwierzęcej z pożywki do dojrzewania oocytów i hodowli zarodków byłaby bardzo korzystna. Białko roślinne, w porównaniu do surowicy zwierzęcej, nie wykazuje zmienności pomiędzy wyprodukowanymi seriami, przez co standaryzuje warunki hodowli *in vitro*.

Kolejnym obiecującym suplementem pożywki do dojrzewania oocytów bydłych wydaje się być hialuronian. Dotychczasowe badania z użyciem hialuronianu (HA) w pożywkach koncentrowały się na określeniu jego wpływu na rozwój zarodków (Palasz i in., 2006, 2008; Furnus i in., 1998), nie znaleziono pracy nad wpływem dodatku HA do pożywki na dojrzewanie oocytów. Hialuronian lub kwas hialuronowy jest polisacharydem o wysokiej masie molekularnej, należy do glukozaminoglikanów (GAG), a do jego istotnych cech należy m. in. aktywność antyoksydacyjna i antyapoptotyczna. Obecność HA stwierdzono w macierzy zewnątrzkomórkowej większości tkanek zwierzęcych, ponadto w płynach: pęcherzykowym, jajowodowym i macicznym u myszy, świni i krowy. Z kolei, badania Furnus i in. (2003) oraz Schoenfelder i Einspanier (2003) wykazały obecność głównego receptora dla HA, CD44, na powierzchni oocytu bydłego oraz w jego cytoplazmie.

Użycie HA w pożywkach do dojrzewa-

nia zarodków prowadziło do obiecujących wyników. Wykazano korzystny wpływ HA na jakość uzyskanych *in vitro* blastocyst oraz zaobserwowano statystycznie wyższą efektywność metody IVP u bydła (Palasz i in., 2006, 2008). Pozytywny wpływ HA wykazywał w stężeniu 1 mg/ml i 2,5 mg/ml (Furnus i in., 1998; Palasz i in., 2006), jednak tylko w obecności BSA. Nie stwierdzono korzystnego wpływu HA w obecności FCS (Palasz i in., 2006). Powodem może być zablokowanie przez cząsteczki FCS receptorów RHAMM, które – obok CD44 – są kolejnymi receptorami dla hialuronianu (Stojkovic i in., 2003).

Podsumowując omówione badania można stwierdzić, że problematyka opracowania optymalnej pożywki do dojrzewania oocytów *in vitro* nie traci na aktualności. Poszukiwane i badane są nowe związki, jak np. białko roślinne czy hialuronian, ale jednocześnie w oparciu o już istniejące suplementy testowane są różne ich układy, których wzajemne interakcje mogą działać stymulująco lub hamująco na ścieżki indukcji dojrzewania meiotycznego i cytoplazmatycznego, czego przykładem jest np. synergistyczna zależność pomiędzy FSH a czynnikiem EGF.

Literatura

- Ali A., Sirard M.A. (2002). Effect of the absence or presence of various protein supplements on further development of bovine oocytes during *in vitro* maturation. *Biol. Reprod.*, 66 (4): 901–905.
- Bochenek M., Smoraż Z. (2008). The effect of a plant protein component of media used for bull sperm sexing on sperm membrane status. *Reprod. Fert. Dev.*, 20: p. 209.
- Chung J.T., Tosca L., Huang T.H., Xu L., Niwa K., Chian R.C. (2007). Effect of polyvinylpyrrolidone on bovine oocyte maturation *in vitro* and subsequent fertilization and embryonic development. *Reprod. Biomed. Online*, 15 (2): 198–207.
- Fouladi-Nashta A.A., Alberio R., Kafi M., Nicholas B., Campbell K.Y., Webb R. (2005). Differential staining combined with TUNEL labelling to detect apoptosis in the preimplantation bovine embryos. *Reprod. Biomed. Online*, 10: 497–502.
- Furnus C.C., Matos D.G. de., Martínez A.G. (1998). Effect of hyaluronic acid on development of *in vitro* produced bovine embryos. *Theriogenology*, 49: 1489–1499.
- Furnus C.C., Valcarcel A., Dulout F.N., Errecalde A.L. (2003). The hyaluronic acid receptor (CD44) is expressed in bovine oocytes and early stage embryos. *Theriogenology*, 60: 1633–1644.
- Gajda B., Bryła M., Smoraż Z. (2007). Effect of protein source on *in vitro* development of porcine embryos. *Mat. I Zimowej Konferencji TBR: Centralne i Lokalne Regulacje Procesów Rozrodczych*, 12–14 marca 2007, s. 87.
- Kątska-Książkiewicz L., Ryńska B., Bochenek M., Opiela J., Jurkiewicz J. (2006). *In vitro* production of bovine embryos using flow-cytometrically sexed sperm. *Arch. Tierz. Dummerstorf*, 49 (2): 133–140.
- McElroy S.L., Byrne J.A., Chavez S.L., Behr B., Hsueh A.J., Westphal L.M., Pera R.A. (2010). Parthenogenic blastocysts derived from cumulus-free *in vitro* matured human oocytes. *PLoS One*, 5 (6): e10979.
- Palasz A.T., Rodriguez-Martinez H., Beltran-Breña P., Perez-Garnelo S., Martinez M.F., Gutiérrez-Adán A., Fuente J. de la (2006). Effects of hyaluronan, BSA, and serum on bovine embryo *in vitro* development, ultrastructure, and gene expression patterns. *Mol. Reprod. Dev.*, 73: 1503–1511.
- Palasz A.T., Breña P.B., Martinez M.F., Perez-Garnelo S.S., Ramirez M.A., Gutiérrez-Adán A., Fuente J. de la (2008). Development, molecular composition and freeze tolerance of bovine embryos cultured in TCM-199 supplemented with hyaluronan. *Zygote*, 16: 39–47.
- Rizos D., Gutiérrez-Adán A., Perez-Garnelo S., Fuente J. de la, Boland M.P., Lonergan P. (2003). Bovine embryo culture in the presence or absence of serum: Implications for blastocysts development, cryotolerance, and messenger RNA expression. *Biol. Reprod.*, 68: 224–236.
- Russell D.F., Baqir S., Bordignon J., Betts D.H. (2006). The impact of oocyte maturation media on early bovine embryonic development. *Mol. Reprod. Dev.*, 73: 1255–1270.

Schoenfelder M., Einspanier R. (2003). Expression of hyaluronan synthases and corresponding hyaluronan receptors is differentially regulated during oocyte maturation in cattle. *Biol. Reprod.*, 69: 269–277.

Sirard M.A., Coenen K. (2006). *In vitro* maturation and embryo production in cattle. *Methods Mol. Biol.*, 348: 35–42.

Stojkovic M., Krebs O., Kolle S., Prella K., Assmann V., Zakhartchenko V., Sinowatz F., Wolf E. (2003). Developmental regulation of hyaluronan-binding protein (RHAMM/IHABP) expression in early embryos. *Biol. Reprod.*, 68: 60–66.

Tkachenko O.Y., Delimitreva S., Isachenko E., Valle R.R., Michelmann H.W., Berenson A., Nayudu P.L. (2010). Epidermal growth factor effects on marmoset monkey (*Callithrix jacchus*) oocyte *in vitro* maturation, IVF and embryo development are altered by gonadotrophin concentration during oocyte maturation. *Hum. Reprod.*, 25 (8): 2047–2058.

Uhm S.J., Gupta M.K., Yang J.H., Chung H.J., Min T.S., Lee H.T. (2010). Epidermal growth factor can be used in lieu of follicle-stimulating hormone for nuclear maturation of porcine oocytes *in vitro*. *Theriogenology*, 73 (8): 1024–1036.

Wani N., Wernery U. (2010). *In vitro* maturation of dromedary (*Camelus dromedarius*) oocytes: Effect of different protein supplementations and epidermal growth factor. *Reprod. Domest. Anim.*

Warzych E., Wrenzycki C., Peippo J., Lechniak D. (2007 a). Maturation medium supplements affect transcript level of apoptosis and cell survival related genes in bovine blastocysts produced *in vitro*. *Mol. Reprod. Dev.*, 74 (3): 280–289.

Warzych E., Peippo J., Szydłowski M., Lechniak D. (2007 b). Supplements to *in vitro* maturation media affect the production of bovine blastocysts and their apoptotic index but not the proportions of matured and apoptotic oocytes. *Anim. Reprod. Sci.*, 97 (3–4): 334–343.

CHARACTERIZATION OF SELECTED SUPPLEMENTS FOR OOCYTES' *IN VITRO* MATURATION MEDIUM

Summary

This review will describe few supplements for oocytes' *in vitro* maturation medium including IGF-I, EGF and hyaluronan. Additionally, the problem of replacing the animal serum with synthetic macromolecules such as PVP and PVA or plant protein is also discussed.



Park w Balicach
Park in Balice
(fot. D.D.)