

А. В. Лопухов

Влияние клеток кумулюса и продолжительности культивирования на ядерное созревание ооцитов половозрелых и неполовозрелых особей *Sus scrofa domesticus*

Аннотация.

Цель: Оценка способности ооцитов свиней к ядерному созреванию в зависимости от морфологии окружающих их клеток кумулюса, продолжительности созревания *in vitro* (IVM) и физиологического статуса животных-доноров ооцит-кумулюсных комплексов (ОКК).

Материалы и методы. Полученные из яичников циклирующих (половозрелых) и нециклирующих (неполовозрелых) свинок ОКК распределяли по категориям в зависимости от количества слоев окружающих ооцит клеток кумулюса (КК): ОКК I – более 4, ОКК II – 3-4, ОКК III – 1-2 и ОКК с клетками гранулезы (ГОКК). Ооциты в составе ОКК созревали в течение первых 22 часов культивирования в среде ТС-199 с 25 мМ НЕР-ЕС, 3,05 мМ D-глюкозы, 0,91 мМ пирувата натрия, 0,57 мМ цистеина, 0,4 % БСА, 10 % фолликулярной жидкости, 0,5 мкг/мл ФСГ, 0,5 мкг/мл ЛГ и 50 мкг/мл гентамицина сульфата и далее в среде того же состава, но без гормонов. Через 40, 42, 44, 46 и 48 часов культивирования оценивали созревание ооцитов всех категорий и возрастных групп по признаку выделения ими первого полярного тельца.

Результаты. Показано, что для обеспечения высокого уровня ядерного созревания ооцитам половозрелых свиней требуется не менее 42 часов культивирования *in vitro*. При этом продолжительность созревания ооцитов неполовозрелых свиней составляет от 44 до 48 часов. Ооциты, окруженные 1-2 слоями КК, в случае культивирования менее 48 часов уступают по ядерному созреванию ооцитам с более многослойным кумулюсом. Наличие клеток гранулезы (КГ) в составе ОКК замедляет прогрессию ядерного созревания при культивировании менее 42 часов у неполовозрелых и 44 часов у половозрелых свинок. Ооциты циклирующих свинок достигают пика созревания раньше, чем нециклирующих, но при этом не уступают им по эффективности ядерного созревания и могут быть использованы во вспомогательных репродуктивных технологиях (ВРТ).

Заключение. При выборе продолжительности культивирования ооцитов свиней с целью их созревания *in vitro* следует учитывать как морфологию окружающих клеток кумулюса, так и физиологический статус ОКК.

Ключевые слова: свиньи; ооцит-кумулюсный комплекс; продолжительность *in vitro* созревания.

Авторы:

Лопухов А. В. – e-mail: vubi_myaso@mail.ru.

ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр животноводства – ВИЖ имени академика Л. К. Эрнста», 142132, Россия, Московская область, городской округ Подольск, поселок Дубровицы, д. 60.

Введение. Вспомогательные репродуктивные технологии (ВРТ), такие как оплодотворение *in vitro* (IVF), получение эмбрионов *in vitro* (*in vitro* embryo production, IVEP) и перенос ядер соматических клеток (somatic cell nuclear transfer, SCNT) неразрывно связаны с процессом созревания ооцитов *in vitro* [1-3]. В ооцитах большинства видов домашних животных после помещения в среду культивирования спонтанно возобновляется мейоз с последующей его пролонгацией до стадии МII и выделением первого полярного тельца (ППТ) [4]. В частности, ооциты свиней с ППТ обнаруживают уже через 32-36 часов от начала культивирования *in vitro* [5]. При этом максимальных значений ядерное созревание по сведениям разных авторов достигает

к 40-48 часам инкубации, что может зависеть как от физиологических, так и цитологических факторов [6-8].

Ооциты, извлекаемые, как правило, из антральных фолликулов, по окончании ядерного созревания могут иметь незрелую цитоплазму [9]. Как известно, полное цитоплазматическое созревание позволяет ооциту накапливать больше белков, мРНК и транскрипционных факторов для обеспечения последующей активации и раннего эмбриогенеза [10]. По этой причине существуют предположения о необходимости дополнительного культивирования ооцитов *in vitro* после достижения стадии МII [11]. С другой стороны, несмотря на перспективу приобретения полной функциональной компетентности, пролонгирова-

ние нахождения ооцитов в состоянии мейотического ареста может также приводить и к негативным последствиям, связанным с индукцией процессов старения: повреждению компонентов цитоскелета, изменению морфологии, фрагментации, нарушению плоидности и снижению потенциала к последующему эмбриональному развитию [12-14]. К настоящему времени вопрос об оптимальной продолжительности созревания ооцитов свиней *in vitro* все еще остается дискуссионным и требует детализации.

По литературным данным селекция ооцитов по качеству на основе морфологической оценки ооцит-кумулюсных комплексов (ОКК) перед постановкой на *in vitro* созревание (IVM) представляется дополнительным источником повышения потенции к созреванию ооцитов и их последующему эмбриональному развитию [15]. Как известно, двунаправленное взаимодействие с фолликулярным окружением посредством транспорта небольших молекул через щелевые контакты поддерживает широкий спектр функций созревающего ооцита, включая метаболизм, арест и возобновление мейоза, а также перестройки цитоскелета [16-18]. Клетки кумулюса (КК) защищают ооцит от липотоксических эффектов окружающей среды при *in vitro* культивировании, таких как образование активных форм кислорода, активацию каспазы-3 и разрушение митохондрий [19-20]. Неоднородность роста антральных фолликулов определяет вариабельность по количеству КК между ОКК в средней популяции, и в большинстве лабораторий для ВРТ чаще всего используют ооциты, созревшие *in vitro* и окруженные четырьмя и более слоями плотно упакованных или экспандированных КК [21], при этом большая часть ОКК не находит своего применения [22]. Однако выбор таких морфологически «лучших» ОКК не всегда сопряжен с лучшим созреванием и эмбриональным развитием [23].

Стоит отметить, что в числе выделяемых из фолликулов ОКК встречаются комплексы, включающие наряду с ооцитом и покрывающими его КК также и прилегающие к ним клетки гранулезы (КГ). В настоящее время роль гранулезных клеток в приобретении ооцитом стадии МII и способности к эмбриональному развитию еще не полностью известна. Есть мнение, что КГ могут участвовать в регуляции созревания ооцитов через ингибирование мейоза между стадиями MI и MII [24].

На эффективность созревания также влияет физиологический статус животного-донора ооцитов для IVER. В странах с развитым свиновод-

ством с целью получения мясной продукции свинок забивают до физиологической зрелости, что обуславливает выбор нециклирующих свинок в качестве основного источника ооцитов для ВРТ. Однако предполагают, что ооциты от животных с отсутствием полноценных эстральных циклов могут иметь пониженную метаболическую активность и неправильное распределение органелл в ооплазме, не соответствующее стадии МII [25-26]. Была даже высказана гипотеза о неспособности таких ооцитов к завершению цитоплазматического созревания [27].

В настоящем исследовании нами была проведена оценка способности ооцитов свиней к ядерному созреванию в зависимости от морфологии окружающих их фолликулярных клеток, продолжительности созревания *in vitro* (IVM) и физиологического статуса животных-доноров ооцит-кумулюсных комплексов (ОКК).

Материалы и методы. Материалом для исследований служили ОКК, выделенные из яичников циклирующих и нециклирующих свинок (*Sus scrofa domesticus*), отобранных после убоя в независимости от возраста и породной принадлежности. О принадлежности яичников к той или иной физиологической группе животных различной половой зрелости судили по наличию (циклирующие) или отсутствию (нециклирующие) на их поверхности желтых тел. Яичники без видимых признаков патологии извлекали через небольшой разрез в брюшной полости, помещали в термос с теплым физиологическим раствором (32-35°C) и доставляли в лабораторию в течение 1-2 часов. После транспортировки яичники освобождали от лишних тканей и промывали не менее 3 раз в стерильном физиологическом растворе, дополненном антибиотиками (100 МЕ пенициллина и 50 мкг/мл стрептомицина). ОКК выделяли методом рассечения стенок видимых фолликулов диаметром 3-8 мм стальным лезвием и отмывали не менее 3 раз в среде ТС-199, содержащей 25 мМ HEPES, с добавлением 2,5 мМ пирувата натрия, 0,57 мМ цистеина, 5% ФБС и 50 мг/мл гентамицина. Для дальнейшего культивирования отбирали ооциты с однородной гранулированной цитоплазмой и окруженные КК.

Всего было выделено 3963 ОКК. В пределах каждой возрастной группы (циклирующие, пц=1923 и нециклирующие свинки, пнц=2040) ОКК подразделяли на категории в соответствии с морфологией и количеством прилегающих к ооцитам фолликулярных клеток. К категории ОКК I (пц=533 и пнц=342) относили ооциты,

окруженные 4 и более слоями КК. Категория ОКК II (пц=541 и пнц=853) включала ооциты, покрытые 3-4 слоями КК. В состав ОКК III (пц=605 и пнц=615) входили ооциты с 1-2 слоями КК, а ГОКК (пц=230 и пнц=244) – ооциты, окруженные КК и КГ.

После распределения ОКК помещали в 500 мкл среды TC-199, содержащей 25 мМ NEPERES, с добавлением 3,05 мМ D-глюкозы, 0,91 мМ пирувата натрия, 0,57 мМ цистеина, 0,4 % БСА, 10 % фолликулярной жидкости, 0,5 мкг/мл ФСГ, 0,5 мкг/мл ЛГ и 50 мкг/мл гентамицина сульфата и культивировали при 38,5°C, 90 % влажности и 5% CO₂ в атмосфере группами по 20-25 шт. с целью созревания. Через 22 часа ОКК переносили и в дальнейшем культивировали в той же среде, но без гормонов. ОКК всех категорий и возрастных групп животных созревали *in vitro* в течение 40, 42, 44, 46 или 48 часов. По окончании культивирования ОКК инкубировали в течение 1 мин в 0,1 % растворе гиалуронидазы при 37°C и удаляли КК аккуратным механическим пипетированием микропипеткой с диаметром отверстия 130 мкм. После 40 часов и далее через каждые два часа культивирования определяли долю созревших ооцитов как выраженное в процентах отношение числа ооцитов с ППТ к общему числу клеток, поставленных на созревание.

Данные обрабатывали однофакторным дисперсионным анализом (one-way Anova) с использованием программного обеспечения SigmaStat («Systat Software, Inc.», США). Результаты экспериментов представлены в виде средних значений (М) и стандартных ошибок средних ($\pm$ SEM). Для оценки достоверности различий между сравниваемыми средними значениями использовали критерий Тьюки.

Результаты и обсуждение. В настоящей работе впервые было проведено исследование комбинации факторов продолжительности культивирования, КК и КГ, а также физиологического статуса животных-доноров на ядерное созревание ооцитов свиней.

Мы наблюдали, что доля ооцитов с ППТ всех морфологических категорий после 40 часов IVM (рис. 1 А, Б) была существенно ниже (не менее $p < 0,01$), чем после 42-48 ч (циклирующие свинки) и 44-48 ч IVM (нециклирующие свинки). По всей видимости, продолжительность созревания в течение 40 ч не способствует в полной мере зрелости метафазного веретена у ооцитов свиней и является недостаточной для перехода большинства из них на стадию МII. Хотя в некоторых публикациях рекомендуется использовать ооциты в качестве со-

зревших уже после 32-36 ч IVM [28-29], данное исследование показало, что в основной массе ооциты свиней завершают ядерное созревание позднее 40 ч IVM.

Стоит отметить, что в динамике выход ооцитов с ППТ, начиная с 42 ч IVM у циклирующих и 44 ч IVM у нециклирующих свинок, в дальнейшем существенно не изменялся. Таким образом, в качестве времени ядерного созревания ооцитов свиней следует рассматривать для неполовозрелых свинок – 44-48 ч IVM, а для половозрелых свинок – 42-48 ч IVM.

Наличие у ооцита фолликулярного окружения, особенно в первые несколько часов созревания, имеет первостепенное значение для ядерного созревания и последующего эмбрионального развития. Удаление КК перед IVM может приводить к дегенерации и апоптозу созревающего ооцита [30-32]. По этим причинам в настоящей работе мы не использовали для IVM ооциты без КК. Ооциты остальных категорий ОКК от неполовозрелых свинок, окруженные КК, после 40, 42, 44, 46 и 48 ч IVM не различались по ядерному созреванию (рис. 1 Б). В тоже время у половозрелых животных ооциты из ОКК I, созревавшие в течение 42-46 ч, выделяли ППТ и завершали ядерное созревание более эффективно, чем ооциты из ОКК III ($p < 0,01$), и не отличались по этому показателю от ооцитов второй категории (рис. 1 А). Есть мнение, что ооциты со слабым кумулюсным окружением (менее чем с 3 слоями КК) не приобретают функциональной компетентности к созреванию из-за недостаточной секреции факторов, детерминирующих созревание [22].

Кроме того, в той же работе было высказано предположение, что для достижения максимального уровня ядерного созревания ооцитам более низкого качества может потребоваться увеличение продолжительности IVM [22]. Действительно, в нашем случае ооциты циклирующих свинок с 1-2 слоями КК демонстрировали наивысшие значения ядерного созревания на 2 часа позднее, чем ооциты остальных морфологических категорий, а после 48 ч IVM между ними уже не было выявлено различий (рис. 2 Б).

Вместе с тем ооциты половозрелых свиней, принадлежащие категории ГОКК, после 40 ч созревания существенно отставали по зрелости ядра по сравнению с ооцитами ОКК I-III (не менее $p < 0,05$) (рис 1 А). Вероятно, это связано со свойствами КГ ингибировать течение мейоза [33-34].

В литературе сообщается о замедленной прогрессии ядерного созревания у ооцитов ГОКК в сопоставлении с ооцитами ОКК без КГ. По мне-

нию авторов, это может иметь положительное влияние на цитоплазматическое созревание через поддержание КГ функций нижележащих КК [7]. Однако нами выявлено, что частота ядерного созревания ооцитов ГОКК и других категорий ОКК оставалась постоянной уже после 42 ч IVM у половозрелых и 44 ч IVM у неполовозрелых свинок.

Ооциты из ГОКК и ОКК I от половозрелых свинок превосходили по частоте созревания ооциты от неполовозрелых свинок после 42 ч IVM на 24,6 и 22,5 % ($p < 0,001$). Более того,

процент ооцитов на стадии М II у циклирующих свинок достигал плато на 2 часа раньше, чем у нециклирующих свинок, и в дальнейшем не претерпевал существенных изменений.

Вероятно, что ооциты от половозрелых животных в силу физиологических особенностей животных доноров, наличия регулярных половых циклов и возрастных особенностей эндокринной системы склонны к более раннему созреванию. Необходимо отметить, что качество ооцита помимо числа слоев КК определяется и

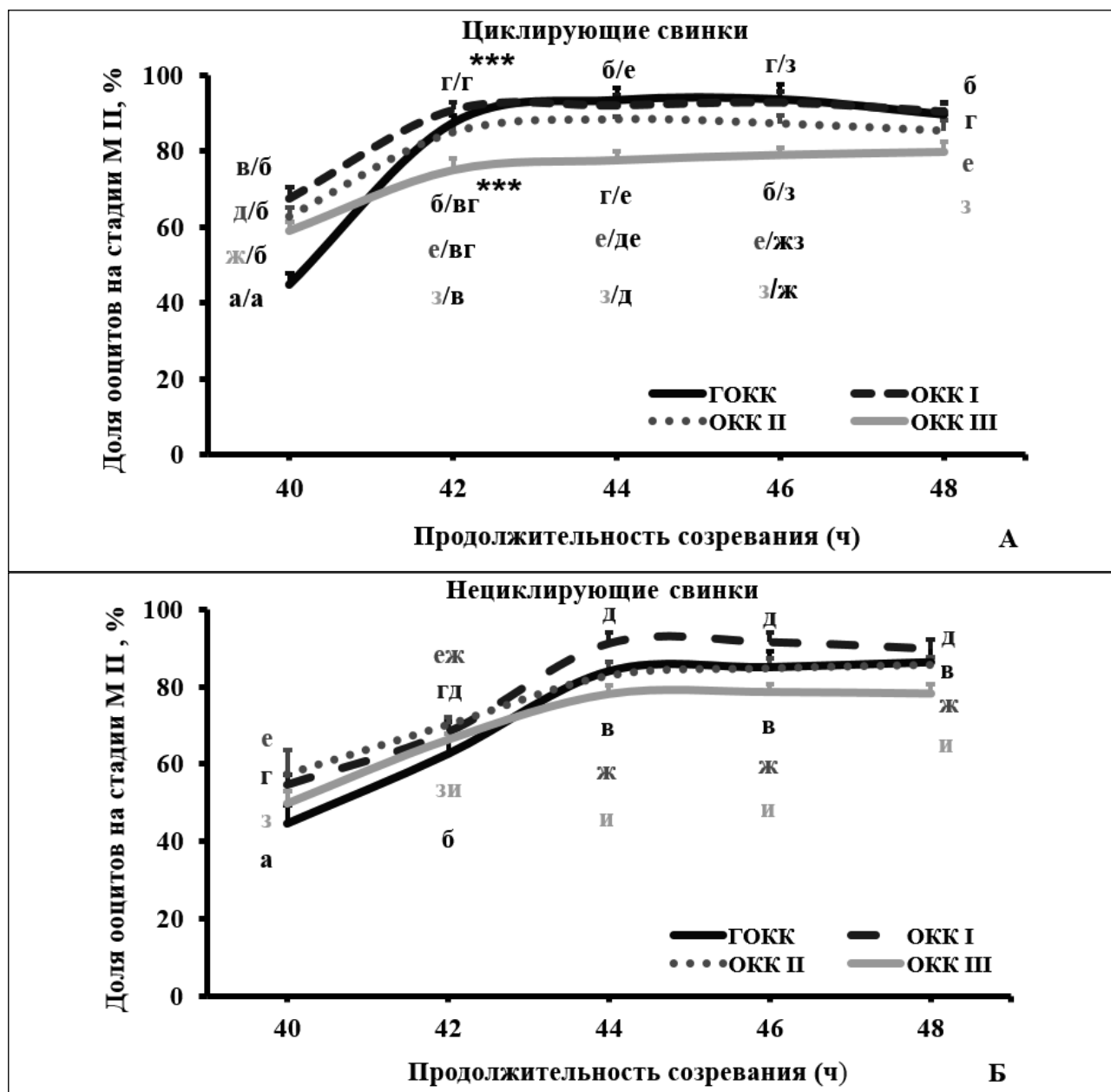


Рис. 1. Созревание ооцитов циклирующих (А) и нециклирующих (Б) свинок в составе ОКК различной морфологии в зависимости от продолжительности культивирования in vitro.

Примечание: ГОКК – ОКК с клетками гранулы, ОКК I – ОКК с 4 и более слоями КК, ОКК II – ОКК, покрытые 3-4 слоями КК, и ОКК III – ОКК, окруженные 1-2 слоями КК. Различные буквенные символы свидетельствуют о наличии достоверных различий [как минимум $p < 0,05$] между группами в зависимости от продолжительности культивирования и категории ОКК. ***- достоверные различия по сравнению с соответствующими группами у нециклирующих свинок ($p < 0,001$).

другими его морфологическими свойствами. В частности, известно, что средний размер фолликула и диаметр ооцита у нециклирующей свинки меньше, чем у циклирующей [35-36]. При этом весьма вероятно, что ооциты маленького диаметра находятся в стадии роста и имеют незрелую цитоплазму [35,37].

Во время данного исследования мы не использовали фолликулы величиной менее 3 мм и ооциты маленького диаметра. Мы считаем, что при таких критериях отбора ооциты как половозрелых, так и неполовозрелых свинок могут быть в равной степени использованы в рамках IVER.

Выводы. Таким образом, в настоящем исследовании выявлено влияние факторов продолжительности созревания, КК и КГ и физиологического статуса ооцитов свинок на эффективность

ядерного созревания. Показано, что для обеспечения высокого уровня ядерного созревания ооцитам от половозрелых свинок требуется не менее 42 ч культивирования *in vitro*. Продолжительность созревания ооцитов от неполовозрелых свинок составляет от 44 до 48 ч.

Ооциты, окруженные 1-2 слоями КК, в случае культивирования менее 48 ч уступают по ядерному созреванию ооцитам с более многослойным кумулюсом. Наличие КГ вокруг ОКК замедляет прогрессию ядерного созревания при культивировании менее 42 ч у неполовозрелых и 44 ч у половозрелых свинок. Ооциты циклирующих свинок выходят на пик созревания раньше, чем нециклирующих, но при этом не уступают им по эффективности ядерного созревания и могут быть использованы в ВРТ.

*Работа выполнена при финансовой поддержке
Министерства науки и высшего образования РФ (ГЗ № 0445-2021-0004).*

Литература

1. Leal G. R. The Simulated Physiological Oocyte Maturation (SPOM) system in domestic animals: A systematic review / G. R. Leal, C. A. S. Monteiro, L. R. Carvalheira, J. M. G. Souza-Fabjan // *Theriogenology*. — 2022. — Vol. 188. — P. 90-99. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2022.05.023.
2. Dang-Nguen T. Q. In vitro production of porcine embryos: current status, future perspectives and alternatives applications / T. Q. Dang-Nguen, T. Somfai, S. Haraguchi, K. Kikuchi, A. Tajima, Y. Kanai, T. Nagai // *Anim. Sci. J.* — 2011. — Vol. 82(3). — P. 374-382. DOI: 10.1111/j.1740-0929.2011.00883.x.
3. Lee J. 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 / J. Lee, H. Lee, Y. Lee, B. Park, F. Elahi, S. T. Lee, C. K. Park, S. H. Hyun, E. Lee // *Reprod. Fertil. Dev.* — 2017. — Vol. 29(8). — P. 1625-1634. DOI: 10.1071/RD15488.
4. Pincus G. The comparative behavior of mammalian eggs in vivo and in vitro: I. The activation of ovarian eggs / G. Pincus, E. V. Enzmann // *J. Exp. Med.* — 1935. — Vol. 62(5). — P. 665-675. DOI:10.1084/jem.62.5.665.
5. Marques M. G. Effect of culture media on porcine embryos produced by in vitro fertilization or parthenogenetic activation after oocyte vitro maturation with cycloheximide / M. G. Marques, A. B. Nascimento, R. P. da Costa Gerger, J. S. de Arruda Gonzalves, A. R. de Sousa Coutinho, R. Simxes, M. E. Ortiz D'Avila Assumpcao, J. A. Visintin // *Zygote*. — 2011. — Vol. 19(4). — P. 331-337. DOI: 10.1017/S0967199410000614.
6. Somfai T. Relationship between the morphological changes of somatic compartment and the kinetics of nuclear and cytoplasmic maturation of oocytes during in vitro maturation of porcine follicular oocytes / T. Somfai, K. Kikuchi, A. Onishi, M. Iwamoto, D-I Fuchimoto, A. B. Papp, E. Sato, T. Nagai // *Mol. Reprod. Dev.* — 2004. — Vol. 68(4). — P. 484-491. DOI: 10.1002/mrd.20103.
7. Iwamoto M. Low oxygen tension during in vitro maturation of porcine follicular oocytes improves parthenogenetic activation and subsequent development to the blastocyst stage / M. Iwamoto, A. Onishi, D. Fuchimoto, T. Somfai, K. Takeda, T. Tagami, H. Hanada, J. Noguchi, H. Kaneko, T. Nagai, T. Kikuchi // *Theriogenology*. — 2005. — Vol. 63. — P. 1277-1289. doi: 10.1016/j.theriogenology.2004.05.024.
8. Hua Z. D. Effect of cumulus-oocyte complexes (COCs) culture duration on in vitro maturation and parthenogenetic development of pig oocyte / Z. D. Hua, X. M. Zheng, Q. X. Wei, H. Q. Xu, Y. G. Wang, X. M. Liu, L. Li, H. W. Xiao, X. F. Qiao // *Afr. J. Biotechnol.* — 2011. — Vol. 10(5). — P. 867-873. DOI: 10.5897/AJB10.1613.

9. Pawlak P. No single way to explain cytoplasmic maturation of oocytes from prepubertal and cyclic gilts / P. Pawlak, A. Cieslak, E. Warczyk, Z. Zejden, M. Szumacher-Strabel, M. Molinska-Glura, D. Lechniak // *Theriyogenology*. — 2012. — Vol. 78(9). — P. 2020-2030. DOI: 10.1016/j.theriyogenology.2012.07.023.
10. Landim Alvarenga F. C. Control of oocyte maturation / F. C. Landim Alvarenga, R. R. D. Maziero // *Anim. Reprod.* — 2014. — Vol. 11(3). — P. 150-158. <http://hdl.handle.net/11449/117702>.
11. Song K. Modification of maturation condition improves oocyte maturation and in vitro development of somatic cell nuclear transfer pig embryos / K. Song, E. Lee // *J. Vet. Sci.* — 2007. — Vol. 8(1). — P. 81-87. DOI:10.4142/jvs.2007.8.1.81.
12. Miao Y. L. Oocyte aging: cellular and molecular changes, developmental potential and reversal possibility / Y. L. Miao, K. Kikuchi, Q. Y. Sun, H. Shatten // *Hum. Reprod. Update.* — 2009. — Vol. 15(5). — P. 573-575. DOI: 10.1093/humupd/dmp014.
13. Wang Y. N-acetyl-L-cysteine (NAC) delays post-ovulatory oocyte aging in mouse / Y. Wang, L. Li, L.H. Fan, Y. Jing, J. Li, Y.C. Ouyang, Z.B. Wang, Y. Hou, Q.Y. Sun // *Aging (Albany NY)*. — 2019. — Vol. 11(7). — P. 2020-2030. DOI:10.18632/aging.101898.
14. Di Nisio V. In vivo and in vitro postovulatory aging: when time works against oocyte quality? / V. Di Nisio, S. Antonouli, P. Damdimopoulou, A. Salumets, S. Cecconi, on behalf of Sierr // *J. Assist. Reprod. Genet.* — 2022. — Vol. 39(4). — P. 905-918. DOI: 10.1007/s10815-022-02418-y.
15. Ozturk S. Selection of competent oocytes by morphological criteria for assisted reproductive technologies / S. Ozturk // *Mol. Reprod. Dev.* — 2020. — Vol. 87(10). — P. 1021-1036. DOI: 10.1002/mrd.23420.
16. Coticchio G. Oocyte maturation: gamete-somatic cells interactions, meiotic resumption, cytoskeletal dynamics and cytoplasmic reorganization / G. Coticchio, M. Dal Canto, M. M. Renzini, M. C. Guglielmo, F. Brambillasca, D. Turchi, P. V. Novara, R. Fadini // *Hum. Reprod. Update.* — 2015. — Vol. 21(4). — P. 427-454. DOI: 10.1093/humupd/dmv011.
17. Alam Md. H. Interaction between growing oocytes and granulosa cells in vitro / Md. H. Alam, T. Miyano // *Reprod. Med. Biol.* — 2020. — Vol. 19(1). — P.13-23. DOI: 10.1002/rmb2.12292.
18. Straczynska P. Signaling mechanisms and their regulation during in vivo or in vitro maturation of mammalian oocytes / P. Straczynska, K. Papis, E. Morawiec, M. Czerwinski, Z. Gajewski, A. Olejek, A. Bednarska-Czerwinska // *Reprod. Biol. Endocrinol.* — 2022. — Vol. 20(1). — P. 37. DOI: 10.1186/s12958-022-00906-5.
19. Turathum B. The function of cumulus cells in oocyte growth and maturation and in subsequent ovulation and fertilization / B. Turathum, E.M. Gao, R.C. Chian // *Cells*. — 2021. — Vol. 10(9). — P.2292. DOI: 10.3390/cells10092292.
20. Lolicato F. The cumulus cell layer protects the bovine maturing oocyte against fatty acid-induced lipotoxicity / F. Lolicato, J. F. Brouwers, C. H. A. de Lest, R. Wubbolts, H. Aardema, P. Priore, B. A. J. Roelen, J. B. Helms, B. M. Gadella // *Biol. Reprod.* — 2015. — Vol. 92(1). — P. 1–16. DOI: 10.1095/biolreprod.114.120634.
21. Abedeera L. R. In vitro production of embryos in swine / L. R. Abedeera // *Theriyogenology*. — 2002. — Vol. 57(1). — P. 256–273. DOI: 10.1016/s0093-691x(01)00670-7.
22. Lin T. Coculture with good-quality COCs enhances the maturation and development rates of poor-quality COCs / T. Lin, R. K Oqani, J. E. Lee, H. Y. Shin, D. I. Jin // *Theriyogenology*. — 2016. — Vol. 85(3). — P. 396-407. DOI: 10.1016/j.theriyogenology.2015.09.001.
23. Blondin P. Oocyte and follicular morphology as determining characteristics for developmental competence in bovine oocytes / P. Blondin, M. A. Sirard // *Mol. Reprod. Dev.* — 1995. — Vol. 41(1). — P. 54-62. DOI: 10.1002/mrd.1080410109.
24. De Loos A. M. Follicular wall maintains meiotic arrest in bovine oocytes cultured in vitro / A. M. De Loos, E. Zeinstra, M. M. Bevers // *Mol. Reprod. Dev.* — 1994. — Vol. 39(2). — P. 162-165. DOI: 10.1002/mrd.1080390207.
25. Damiani P. Evaluation of developmental competence, nuclear and ooplasmic maturation of calf oocytes / P. Damiani, R. A. Fissore, J. B. Cibelli, C. R. Long, J. J. Balise, J. M. Robl, R. T. Duby // *Mol. Reprod. Dev.* — 1996. — Vol. 45. — P. 521-534. DOI: 10.1002/(SICI)1098-2795(199612)45:4<521::AID-MRD15>3.0.CO;2-Z.

26. Ledda S. Cell coupling and maturation promoting factor activity in in vitro matured prepubertal and adult sheep oocytes / S. Ledda, L. Bogliolo, G. Leoni, S. Naitani // Biol. Reprod. — 2001. — Vol. 65. — P. 247-252. DOI: 10.1095/biolreprod65.1.247.
27. Salamone D. F. Biochemical and developmental evidence that ooplasmic maturation of prepubertal bovine oocytes is compromised / D. F. Salamone, P. Damiani, R. A. J. Fissore, M. Robl, R. T. Duby // Biol. Reprod. — 2001. — Vol. 64. — P. 1761-1768. DOI: 10.1095/biolreprod64.6.1761.
28. Wang Z. K. Maturation and fertilization of porcine oocytes in vitro / Z. K. Wang, P. H. Wei, J. Z. Wang, C. Lei, M. Q. Cou // Theriogenology. — 1992. — Vol. 37(3). — P. 733-739. DOI: 10.1016/0093-691x(92)90152-h.
29. Ikeda K., Takahashi Y. Effects of maturational age of porcine oocytes on the induction of activation and development in vitro following somatic cell nuclear transfer / K. Ikeda, Y. Takahashi // J. Vet. Med. Sci. — 2001. — Vol. 63. — P. 1003-1008. DOI: 10.1292/jvms.63.1003.
30. Wongsrikeao P. Effect of the removal of cumulus cells on the nuclear maturation, fertilization and development of porcine oocytes / P. Wongsrikeao, Y. Kaneshige, R. Ooki, M. Taniguchi, B. Agung, M. Nii, T. Otoi // Reprod. Domest. Anim. — 2005. — Vol. 40(2). — P. 166-170. DOI: 10.1111/j.1439-0531.2005.00576.x. doi: 10.1111/j.1439-0531.2005.00576.x.
31. Lu J. H. Damaging effect of cumulus denudation on rabbit oocytes / J. H. Lu, J. Z. Wang, H. L. Wang, Y., H. S. Sui, Y. Liu, J. J. Li, B. Liang, J. H. Tan // Fertil. Steril. — 2010. — Vol. 93(5). — P. 1567-1573. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2009.05.066.
32. Silvestri S. Identification of optimal assisted aspiration conditions of oocytes for use in porcine in vitro maturation: A re-evaluation of the relationship between the cumulus oocyte complex and oocyte quality / S. Silvestri, C.C., Rathje, S.C. Harvey, R. L. Gould, G. A. Walling, P. J. I. Ellis, K. E. Harvey, D. K. Griffin // Vet Med Sci. — 2021. — Vol. 7. — P. 465-473. Vol. 7: 465–473. DOI: 10.1002/vms3.378.
33. Kawamura K. Preovulatory LH/hCG surge decreases C-type natriuretic peptide secretion by ovarian granulosa cells to promote meiotic resumption of pre-ovulatory oocytes / K. Kawamura, Y. Cheng, N. Kawamura, S. Takae, A. Okada, Y. Kawagoe, S. Mulders, Y. Terada, A. J. W. Hsueh // Hum. Reprod. — 2011. — Vol. 26(11). — P. 3094-3101. DOI: 10.1093/humrep/der282.
34. Pan. B. The art of oocyte meiotic arrest regulation / B. Pan, J. Li // Reprod. Biol. Endocrinol. — 2019. — Vol. 8. — P. 17. DOI: 10.1186/s12958-018-0445-8.
35. Ikeda K., Takahashi Y. Comparison of maturational and developmental parameters of oocytes recovered from prepubertal and adult pigs / K. Ikeda, Y. Takahashi // Reprod. Fertil. Dev. — 2003. — Vol. 15. — P. 215–221. doi: 10.1071/rd02077.
36. Bagg M. A. Effect of dibutyl cAMP on the cAMP content, meiotic progression, and developmental potential of in vitro matured pre-pubertal and adult pig oocytes / M. A. Bagg, M. B. Nottle, C. G. Grupen, D. T. Armstrong // Mol. Reprod. Dev. — 2006. — Vol. 73. — P. 1326-1332. DOI: 10.1002/mrd.20555.
37. Pors S. E. Oocyte diameter predicts the maturation rate of human immature oocytes collected ex vivo / S.E. Pors, D. Nikiforov, J. Cadenas, Z. Ghezelayagh, Y. Wakimoto, L.A.Z. Jara, J. Cheng, M. Dueholm, K.T. Macklon, E.M. Flachs, L.S. Mamsen, S.G. Kristensen, C.Y. Andersen // J. Assist. Reprod. Genet. — 2022. — Vol. 39. — P. 2209-2214. DOI: 10.1007/s10815-022-02602-0.

Lopukhov A.

Effect of cumulus cells and duration of culture on nuclear maturation of oocytes of pubertal and pre-pubertal individuals from *Sus scrofa domesticus*

Abstract.

Objective: to evaluate the nuclear maturation ability of pig oocytes in relation to the morphology of the surrounding cumulus cells, the duration of in vitro maturation (IVM) and the physiological status of cumulus-oocyte complexes (COCs) donor animals.

Materials and methods. COCs collected from cycling (pubertal) and non-cycling (prepubertal) pigs ovaries were categorized according to the number of cumulus cell (CC) layers: COC I – more than 4, COC II – 3-4, COC III – 1-2 and COC with granulosa cells (GCOC). Oocytes within COCs were matured during the first 22 h of culture in the TC-199 medium with 25 mM HEPES, 3.05 mM D-glucose, 0.91 mM sodium pyruvate, 0.57 mM cysteine, 0.4% BSA, 10% follicular fluid, 0.5 µg/mL FSH, 0.5 µg/mL LH and 50 µg/mL gentamicin sulfate and thereafter in medium of the same composition but without hormones. After 42, 44, 46, 48 hours of culture the maturation of oocytes of all categories and age groups was assessed by the sign of their release of the first polar body.

Results. It was shown that at least 42 hours of in vitro culture of pubertal pig oocytes are required to ensure a high level of nuclear maturation. The duration of the in vitro maturation was found to be 44-48 hours for pre-pubertal pigs. Oocytes surrounded by 1-2 layers of CC, when cultured for less than 48 hours, are inferior in nuclear maturation to oocytes with a more multilayered cumulus. The presence of GC (granulosa cells) around COC retards the progression of nuclear maturation when cultured for less than 42 hours in prepubertal and 44 hours in pubertal gilts. Oocytes from cycling pigs reach peak maturation earlier than those from non-cycling gilts and can be used in assisted reproductive technologies (ART).

Conclusions. It was concluded that both morphology of the surrounding cumulus cells and physiologic status of COC donor animals should be considered when choosing the duration of pig oocytes culture for the purpose of their in vitro maturation

Key words: pigs; cumulus-oocyte complex; duration of in vitro maturation.

Author:

Lopukhov A. – e-mail: vubi_myaso@mail.ru. ;

L. K. Ernst Federal Research Center for Animal Husbandry; Dubrovitsy, 60, Podolsk Municipal District, Moscow Region, 142132, Russia.

References

1. Leal G. R. The Simulated Physiological Oocyte Maturation (SPOM) system in domestic animals: A systematic review / G. R. Leal, C. A. S. Monteiro, L. R. Carvalheira, J. M. G. Souza-Fabjan // Theriogenology. – 2022. – Vol. 188. – P. 90-99. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2022.05.023.
2. Dang-Nguen T. Q. In vitro production of porcine embryos: current status, future perspectives and alternatives applications / T. Q. Dang-Nguen, T. Somfai, S. Haraguchi, K. Kikuchi, A. Tajima, Y. Kanai, T. Nagai // Anim. Sci. J. – 2011. – Vol. 82(3). – P. 374-382.
3. Lee J. 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 / J. Lee, H. Lee, Y. Lee, B. Park, F. Elahi, S. T. Lee, C. K. Park, S. H. Hyun, E. Lee // Reprod. Fertil. Dev. – 2017. – Vol. 29(8). – P. 1625-1634. DOI: 10.1071/RD15488.
4. Pincus G. The comparative behavior of mammalian eggs in vivo and in vitro: I. The activation of ovarian eggs / G. Pincus, E. V. Enzmann // J. Exp. Med. – 1935. – Vol. 62(5). – P. 665-675. DOI:10.1084/jem.62.5.665.
5. Marques M. G. Effect of culture media on porcine embryos produced by in vitro fertilization or parthenogenetic activation after oocyte vitro maturation with cycloheximide / M. G. Marques, A. B. Nascimento, R. P. da Costa Gerger, J. S. de Arruda Gonzalves, A. R. de Sousa Coutinho, R. Simxes, M. E. Ortiz D'Avila Assumpcao, J. A. Visintin // Zygote. – 2011. – Vol. 19(4). – P. 331-337.

6. Somfai T. Relationship between the morphological changes of somatic compartment and the kinetics of nuclear and cytoplasmic maturation of oocytes during in vitro maturation of porcine follicular oocytes / T. Somfai, K. Kikuchi, A. Onishi, M. Iwamoto, D-I Fuchimoto, A. B. Papp, E. Sato, T. Nagai // *Mol. Reprod. Dev.* — 2004. — Vol. 68(4). — P. 484-491. DOI: 10.1002/mrd.20103.
7. Iwamoto M. Low oxygen tension during in vitro maturation of porcine follicular oocytes improves parthenogenetic activation and subsequent development to the blastocyst stage / M. Iwamoto, A. Onishi, D. Fuchimoto, T. Somfai, K. Takeda, T. Tagami, H. Hanada, J. Noguchi, H. Kaneko, T. Nagai, T. Kikuchi // *Theriogenology*. — 2005. — Vol. 63. — P. 1277-1289. doi: 10.1016/j.theriogenology.2004.05.024.
8. Hua Z. D. Effect of cumulus-oocyte complexes (COCs) culture duration on in vitro maturation and parthenogenetic development of pig oocyte / Z. D. Hua, X. M. Zheng, Q. X. Wei, H. Q. Xu, Y. G. Wang, X. M. Liu, L. Li, H. W. Xiao, X. F. Qiao // *Afr. J. Biotechnol.* — 2011. — Vol. 10(5). — P. 867-873.
9. Pawlak P. No single way to explain cytoplasmic maturation of oocytes from prepubertal and cyclic gilts / P. Pawlak, A. Cieslak, E. Warcych, Z. Zejden, M. Szumacher-Strabel, M. Molinska-Glura, D. Lechniak // *Theriogenology*. — 2012. — Vol. 78(9). — P. 2020-2030.
10. Landim Alvarenga F. C. Control of oocyte maturation / F. C. Landim Alvarenga, R. R. D. Maziero // *Anim. Reprod.* — 2014. — Vol. 11(3). — P. 150-158. <http://hdl.handle.net/11449/117702>.
11. Song K. Modification of maturation condition improves oocyte maturation and in vitro development of somatic cell nuclear transfer pig embryos / K. Song, E. Lee // *J. Vet. Sci.* — 2007. — Vol. 8(1). — P. 81-87. DOI:10.4142/jvs.2007.8.1.81.
12. Miao Y. L. Oocyte aging: cellular and molecular changes, developmental potential and reversal possibility / Y. L. Miao, K. Kikuchi, Q. Y. Sun, H. Shatten // *Hum. Reprod. Update.* — 2009. — Vol. 15(5). — P. 573-575. DOI: 10.1093/humupd/dmp014.
13. Wang Y. N-acetyl-L-cysteine (NAC) delays post-ovulatory oocyte aging in mouse / Y. Wang, L. Li, L.H. Fan, Y. Jing, J. Li, Y.C. Ouyang, Z.B. Wang, Y. Hou, Q.Y. Sun // *Aging (Albany NY)*. — 2019. — Vol. 11(7). — P. 2020-2030. DOI:10.18632/aging.101898.
14. Di Nisio V. In vivo and in vitro postovulatory aging: when time works against oocyte quality? / V. Di Nisio, S. Antonouli, P. Damdimopoulou, A. Salumets, S. Cecconi, on behalf of Sierr // *J. Assist. Reprod. Genet.* — 2022. — Vol. 39(4). — P. 905-918. DOI: 10.1007/s10815-022-02418-y.
15. Ozturk S. Selection of competent oocytes by morphological criteria for assisted reproductive technologies / S. Ozturk // *Mol. Reprod. Dev.* — 2020. — Vol. 87(10). — P. 1021-1036. DOI: 10.1002/mrd.23420.
16. Coticchio G. Oocyte maturation: gamete-somatic cells interactions, meiotic resumption, cytoskeletal dynamics and cytoplasmic reorganization / G. Coticchio, M. Dal Canto, M. M. Renzini, M. C. Guglielmo, F. Brambillasca, D. Turchi, P. V. Novara, R. Fadini // *Hum. Reprod. Update.* — 2015. — Vol. 21(4). — P. 427-454. DOI: 10.1093/humupd/dmv011.
17. Alam Md. H. Interaction between growing oocytes and granulosa cells in vitro / Md. H. Alam, T. Miyano // *Reprod. Med. Biol.* — 2020. — Vol. 19(1). — P.13-23. DOI: 10.1002/rmb2.12292.
18. Straczynska P. Signaling mechanisms and their regulation during in vivo or in vitro maturation of mammalian oocytes / P. Strączyńska, K. Papis, E. Morawiec, M. Czerwinski, Z. Gajewski, A. Olejek, A. Bednarska-Czerwinska // *Reprod. Biol. Endocrinol.* — 2022. — Vol. 20(1). — P. 37.
19. Turathum B. The function of cumulus cells in oocyte growth and maturation and in subsequent ovulation and fertilization / B. Turathum, E.M. Gao, R.C. Chian // *Cells*. — 2021. — Vol. 10(9). — P.2292. DOI: 10.3390/cells10092292.
20. Lolicato F. The cumulus cell layer protects the bovine maturing oocyte against fatty acid-induced lipotoxicity / F. Lolicato, J. F. Brouwers, C. H. A. de Lest, R. Wubbolts, H. Aardema, P. Priore, B. A. J. Roelen, J. B. Helms, B. M. Gadella // *Biol. Reprod.* — 2015. — Vol. 92(1). — P. 1–16. DOI: 10.1095/biolreprod.114.120634.
21. Abedeera L. R. In vitro production of embryos in swine / L. R. Abedeera // *Theriogenology*. — 2002. — Vol. 57(1). — P. 256–273. DOI: 10.1016/S0093-691X(01)00670-7.
22. Lin T. Coculture with good-quality COCs enhances the maturation and development rates of poor-quality COCs / T. Lin, R. K Oqani, J. E. Lee, H. Y. Shin, D. I. Jin // *Theriogenology*. — 2016. — Vol. 85(3). — P. 396-407. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2015.09.001.

23. Blondin P. Oocyte and follicular morphology as determining characteristics for developmental competence in bovine oocytes / P. Blondin, M. A. Sirard // *Mol. Reprod. Dev.* — 1995. — Vol. 41(1). — P. 54-62. DOI: 10.1002/mrd.1080410109.
24. De Loos A. M. Follicular wall maintains meiotic arrest in bovine oocytes cultured in vitro / A. M. De Loos, E. Zeinstra, M. M. Bevers // *Mol. Reprod. Dev.* — 1994. — Vol. 39(2). — P. 162-165. DOI: 10.1002/mrd.1080390207.
25. Damiani P. Evaluation of developmental competence, nuclear and ooplasmic maturation of calf oocytes / P. Damiani, R. A. Fissore, J. B. Cibelli, C. R. Long, J. J. Balise, J. M. Robl, R. T. Duby // *Mol. Reprod. Dev.* — 1996. — Vol. 45. — P. 521-534. DOI: 10.1002/(SICI)1098-2795(199612)45:4<521::AID-MRD15>3.0.CO;2-Z.
26. Ledda S. Cell coupling and maturation promoting factor activity in in vitro matured prepubertal and adult sheep oocytes / S. Ledda, L. Bogliolo, G. Leoni, S. Naitani // *Biol. Reprod.* — 2001. — Vol. 65. — P. 247-252. DOI: 10.1095/biolreprod65.1.247.
27. Salamone D. F. Biochemical and developmental evidence that ooplasmic maturation of prepubertal bovine oocytes is compromised / D. F. Salamone, P. Damiani, R. A. J. Fissore, M. Robl, R. T. Duby // *Biol. Reprod.* — 2001. — Vol. 64. — P. 1761-1768. DOI: 10.1095/biolreprod64.6.1761.
28. Wang Z. K. Maturation and fertilization of porcine oocytes in vitro / Z. K. Wang, P. H. Wei, J. Z. Wang, C. Lei, M. Q. Cou // *Theryogenology.* — 1992. — Vol. 37(3). — P. 733-739. DOI: 10.1016/0093-691x(92)90152-h.
29. Ikeda K., Takahashi Y. Effects of maturational age of porcine oocytes on the induction of activation and development in vitro following somatic cell nuclear transfer / K. Ikeda, Y. Takahashi // *J. Vet. Med. Sci.* — 2001. — Vol. 63. — P. 1003-1008. DOI: 10.1292/jvms.63.1003.
30. Wongsrikeao P. Effect of the removal of cumulus cells on the nuclear maturation, fertilization and development of porcine oocytes / P. Wongsrikeao, Y. Kaneshige, R. Ooki, M. Taniguchi, B. Agung, M. Nii, T. Otoi // *Reprod. Domest. Anim.* — 2005. — Vol. 40(2). — P. 166-170. DOI: 10.1111/j.1439-0531.2005.00576.x. doi: 10.1111/j.1439-0531.2005.00576.x.
31. Lu J. H. Damaging effect of cumulus denudation on rabbit oocytes / J. H. Lu, J. Z. Wang, H. L. Wang, Y., H. S. Sui, Y. Liu, J. J. Li, B. Liang, J. H. Tan // *Fertil. Steril.* — 2010. — Vol. 93(5). — P. 1567-1573. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2009.05.066.
32. Silvestri S. Identification of optimal assisted aspiration conditions of oocytes for use in porcine in vitro maturation: A re-evaluation of the relationship between the cumulus oocyte complex and oocyte quality / S. Silvestri, C.C., Rathje, S.C. Harvey, R. L. Gould, G. A. Walling, P. J. I. Ellis, K. E. Harvey, D. K. Griffin // *Vet Med Sci.* — 2021. — Vol. 7. — P. 465-473. Vol. 7: 465–473. DOI: 10.1002/vms3.378.
33. Kawamura K. Preovulatory LH/hCG surge decreases C-type natriuretic peptide secretion by ovarian granulosa cells to promote meiotic resumption of pre-ovulatory oocytes / K. Kawamura, Y. Cheng, N. Kawamura, S. Takae, A. Okada, Y. Kawagoe, S. Mulders, Y. Terada, A. J. W. Hsueh // *Hum. Reprod.* — 2011. — Vol. 26(11). — P. 3094-3101. DOI: 10.1093/humrep/der282.
34. Pan. B. The art of oocyte meiotic arrest regulation / B. Pan, J. Li // *Reprod. Biol. Endocrinol.* — 2019. — Vol. 8. — P. 17. DOI: 10.1186/s12958-018-0445-8.
35. Ikeda K., Takahashi Y. Comparison of maturational and developmental parameters of oocytes recovered from prepubertal and adult pigs / K. Ikeda, Y. Takahashi // *Reprod. Fertil. Dev.* — 2003. — Vol. 15. — P. 215–221. doi: 10.1071/rd02077.
36. Bagg M. A. Effect of dibutyl cAMP on the cAMP content, meiotic progression, and developmental potential of in vitro matured pre-pubertal and adult pig oocytes / M. A. Bagg, M. B. Nottle, C. G. Grupen, D. T. Armstrong // *Mol. Reprod. Dev.* — 2006. — Vol. 73. — P. 1326-1332. DOI: 10.1002/mrd.20555.
37. Pors S. E. Oocyte diameter predicts the maturation rate of human immature oocytes collected ex vivo / S.E. Pors, D. Nikiforov, J. Cadenas, Z. Ghezelayagh, Y. Wakimoto, L.A.Z. Jara, J. Cheng, M. Dueholm, K.T. Macklon, E.M. Flachs, L.S. Mamsen, S.G. Kristensen, C.Y. Andersen // *J. Assist. Reprod. Genet.* — 2022. — Vol. 39. — P. 2209-2214. DOI: 10.1007/s10815-022-02602-0.