

<https://doi.org/10.61308/TEPF2324>

Влияние на размера на фоликулите и средите за култивиране върху ин витро матурацията на ювенилни свински ооцити

Цветелина Тодорова и Таня Тодорова*

Селскостопанска академия, Институт по животновъдни науки,
2230 – Костинброд, България

*Кореспондиращ автор: taniakt@abv.bg

Резюме

Матурирането *in vitro* (IVM) на ооцитите е критична стъпка в асистираните репродуктивни технологии, извършвани при свине. Целта на настоящото проучване е да се установи какво влияние оказва използването на определена среда за матуриране върху матурацията на ооцити от фоликули с различни размери. Сравнени бяха резултатите от ооцити от малки фоликули (МФ) и големи фоликули (ГФ), култивирани в среда съдържаща фетален телешки серум (FCS), след 0, 28 и 46 часа IVM. Преди началото на култивирането (0 h), 92% от ооцитите от двата класа фоликули бяха в стадий герминален везикул (GV) и след първата половина на IVM (28 h). В края на култивирането (46 h) и двете групи ооцити завършиха мейозата в МII, като само 83,0% от ооцитите от МФ в сравнение с 94,0% от ГФ достигат този етап. Сравнени бяха резултатите от култивирани в среда съдържаща поливинилалкохол (PVA), след 0, 28 и 46 часа IVM. Преди култивиране (0 h), 94% от ооцитите от малки фоликули и 92,0 % от тези от големи фоликули са били в GV етап.

След 28 часа 90,0% (МФ) и 92,0% (ГФ) от ооцитите бяха в Метафаза I стадий на ядрено съзряване. По-голямата част от ооцитите от двете групи (МФ 94,0%, ГФ 92,0%) са претърпели мейоза до Метафаза II след 46 часа. Настоящото проучване показва, че ооцитите от по-малки фоликули с дефицити в мейотичната компетентност имат проблеми с матурацията на цитоплазмата, които се потенцират при използването на определена среда. Установено беше, че КОК от МФ под въздействието на фетален телешки серум (FCS) показват по-силна лутеинизация в сравнение с КОК от ГФ, но това може да бъде компенсирано чрез използване на среда за матуриране без серум.

Ключови думи: ин витро; свине; матурация; ооцити

Effect of follicle size and culture media on in vitro maturation of juvenile porcine oocytes

Tsvetelina Todorova and Tania Todorova*

Agricultural Academy, Institute of Animal Science, 2230 – Kostinbrod, Bulgaria

*Corresponding author: taniakt@abv.bg

Abstract

Todorova, Ts. & Todorova, T. (2023). Effect of follicle size and culture media on in vitro maturation of juvenile porcine oocytes. *Bulgarian Journal of Animal Husbandry*, 60(5), 12-21 (Bg).

In vitro maturation (IVM) of oocytes is a critical step in the assisted reproductive technologies performed in pigs. The aim of the present study was to determine what effect the use of a particular maturation medium has on the maturation of oocytes from follicles of different sizes. The results of SF and LF oocytes cultured in medium containing FCS after 0, 28 and 46 h of IVM were compared. Before the start of culture (0 h), 92% of oocytes from both classes of follicles were in the GV stage and after the first half of IVM (28 h). At the end of culture (46 h), both groups of oocytes completed meiosis at MII, with only 83.0% of oocytes from SF compared to 94.0% from LF reaching this stage. The results of oocytes, cultured in medium containing PVA, after 0, 28 and 46 hours of IVM were compared. Before culture (0 h), 94% of oocytes from small follicles and 92.0% of those from large follicles were in the GV stage.

After 28 hours, 90.0% (SF) and 92.0% (LF) of oocytes were in the Metaphase I stage of nuclear maturation. The majority of oocytes from both groups (SF 94.0%, LF 92.0%) underwent meiosis to Metaphase II after 46 h. The present study shows that oocytes from smaller follicles with deficiencies in meiotic competence have problems with cytoplasmic maturation that are potentiated by the use of a certain medium. It was found that COCs from SF under the influence of FCS showed stronger luteinization compared to COCs from LF, but this could be compensated by using serum-free maturation medium.

Keywords: *in vitro*; gilts; maturation; oocytes

Въведение

Матурирането *in vitro* (IVM) на ооцитите е критична стъпка в асистираните репродуктивни технологии, извършвани при свине, за генериране на ооцити, способни да бъдат оплодени *in vitro* и осигуряване на здрави млади животни, полезни за биомедицински и селскостопански цели (Lonerган, P. and Fair, T., 2016). Ооцитите, получени от малки до средни фоликули, ако се култивират по подходящ начин, могат да възобновят мейозата и да узреят до състояние, в което могат да бъдат оплодени. Въпреки това, постигането на пълна компетентност за развитие на незрели ооцити, извлечени от нестимулирани яйчници, особено такива от женски животни в предпубертета, продължава да бъде предизвикателство.

При прасетата производството на ембриони от *in vitro* матурирани ооцити придобива все по-голямо значение за биомедицински приложения, особено за предизвикване на генетични промени в животните, които могат да имитират болестни състояния при хора (Prather, R.S., 2013). При създаването на

такива модели, ядрен трансфер на соматични клетки (SCNT) е позволил генните промени, създадени преди това в култивирани соматични клетки чрез различни инструменти за манипулиране на гени, да бъдат интродуцирани в енуклеирани ооцити, а чрез новите технологии като напр. CRISPR-Cas9 могат дори да се направят генетични промени директно в оплодени ооцити (зиготи) (Whitworth, K.M., et al. 2014).

In vivo яйцеклетката на бозайника расте и узрява в среда от соматични клетки, състояща се от кумулусни клетки и постепенно придобива мейотична компетентност и компетентност за развитие в антралната част на фоликулния стадий. Ооцитите и кумулусните клетки трябва да взаимодействат хармонично по отношение на техните метаболитни дейности, за да бъде постигната компетентност (Sánchez, F. and Smitz, J., 2012). Мейотичният арест на ооцитите се поддържа от високото ниво на цикличния аденозин монофосфат (сАМФ), който до голяма степен се произвежда от ооцитите. Проучване на Bagg, M.A. et al. (2009) установява, че натрупването на сАМФ в КОК от фоликули с диаметър 3 mm е по-ни-

ско както в ооцитите, така и в КОК, отколкото във фоликули с диаметър 5–8 mm.

След като кумулусно-ооцитните комплекси (КОК) бъдат отстранени от фоликулярната среда и поставени в среда за култивиране, част от ооцитите обикновено възобновяват мейозата спонтанно. Тази безразборна прогресия към Метафаза II най-вероятно възниква в резултат на намален приток на цикличният гуанозин *монофосфат* (сGMP) от околните кумулузни клетки в ооцита. сGMP поддържа високи вътреклетъчни концентрации и на сAMP чрез инхибиране на фосфодиестеразата, отговорна за хидролизата на сAMP (Vaccari, S. et al., 2009). Спад в концентрациите на цикличните нуклеотиди, които контролират възобновяването на мейозата, причинява несинхронизирана ядрена и цитоплазматична матурация на ооцитите, като по този начин се компрометира правилното им развитие (Sela-Abramovich, S. et al., 2006).

Задействаното от гонадотропините активиране на сигнални мрежи по време на матурирането на яйцеклетките обикновено се ръководи от *epidermal growth factor* (EGF) и свързаните с него фактори и надолу по веригата MAPK1 и MAPK3. Активирането на MAPK1 в гранулозните и кумулузните клетки играе централна роля в задействането на основните етапи на матурирането на ооцитите и експандирането на КОК. Кумулузните клетки в антралните фоликули нямат експресия на рецептори на лутеинизиращ хормон (LH). Следователно, ооцитите, изолирани за ин витро матурация, често реагират слабо на LH и това може да доведе до нерегулирано активиране на (*mitogen activated protein kinase*) MAPK и компрометирана компетентност на ооцитите. В резултат на това средата, използвана за IVM, обикновено се допълва с фоликуло-стимулиращ хормон (FSH) и EGF за стимулиране на чувствителността към LH и сигналните пътища надолу по веригата (Yamashita, Y. et al., 2011). Въпреки това, дори и с тези добавки, ооцитите от много видове все още достигат до пълна матурация достатъчно, което предполага, че необходимите пътища за сигнална трансдукция са били не-

достатъчно или неподходящо стимулирани. Едно от обясненията е, че фоликулярната среда съдържа допълнителни, локално произведени фактори, които са необходими за осигуряване на адекватна подкрепа за сложния процес на растеж на фоликула и узряване на яйцеклетките. Съответно, фоликулярната течност понякога се добавя към средата за култивиране, за да се подобри IVM на ооцитите, въпреки че резултатите не се подобряват универсално (Lonergan, P., and Fair, T., 2016). Включването на фоликулярна течност, за да се насърчи матурацията на ооцитите, изглежда противоречиво тъй като тя съдържа инхибитори на матурирането на ооцитите, като напр. хипоксантин, които спират мейозата (Wigglesworth, K. et al., 2013).

Независимо от това, благоприятните ефекти от използването на фоликулярна течност по време на IVM в много проучвания предоставят доказателства, че съдържащите се в нея растежни фактори може да бъдат от полза за матуриране на ооцитите. Предизвикателството тук е оптималното насърчаване на матурирането на ооцитите, включително ооцити от МФ с намалена компетентност за матуриране. В проучвания на Lucas, X. et al., (2002) растежът на ооцита е почти завършен само при диаметър на фоликула от 2,8 mm с диаметър на яйцеклетката от около 117 μm (без ZP).

Целта на настоящото проучване е да се установи какво влияние оказва използването на определена среда за матуриране върху матурацията на ооцити от фоликули с различни размери. Чрез изясняване на разликите по отношение на механизмите на матуриране трябва да се подобри използваемостта на ооцитите, дори и от малки фоликули, и да се разширят наличните ресурси.

Материали и методи

Получаване на яйчниците.

Яйчниците бяха получавани от хибридни прасета за угодяване от клиницата в гр. Костинброд. Използваха се само яйчници от препубертетни здрави прасета, които нямат на-

личие на жълти тела. Те се поставяха в 0,9% разтвор на NaCl при 36-38 °C при транспортиране до лабораторията. При пристигането си в лабораторията яйчниците се съхраняваха в пресен 0,9% разтвор на NaCl при 36-38° C, до обработката им.

Селекция на фоликулите по размер.

Фоликулите бяха разделени на две групи въз основа на техния размер, който се определяше с помощта на кръгъл шаблон. Повърхностните, интактни фоликули с размер 2,0–4,0 mm се категоризираха като МФ, тези с размер 4,0–6,0 mm се категоризираха като ГФ. След това избраните фоликули се разрязваха със стерилен скалпел и кумулно ооцитните комплекси (КОК) се изплакваха в петриева паничка. Бяха използвани фетален телешки серум (FCS), или поливинилалкохол (PVA). Под стерео микроскоп (10-60x увеличение) получените КОК от съответната група се прехвърляха с помощта на изтеглена на пламък, предварително силиконизирана пипета на Пастър в петриев бляда с 2 ml събирателна среда, която съдържа PVA или FCS съгласно експерименталния дизайн и се промиваха още два пъти в прясна среда. Средата за изплакване и събирателната среда имат температура около 37°C. За получаване на възможно най-ниски отклонения в селекцията на фоликулите и измерването на диаметъра на фоликула те се извършваха при постоянни експериментални условия.

Класификация и *in vitro* матурация на кумулно-ооцитния комплекс.

За експериментите бяха използвани КОК, с равномерно гранулирана ооплазма и заобиколени от най-малко трислоен, неекспандиран *cumulus oophorus*. За основа на средата за култивиране се използваше тъканна среда за култивиране TCM199 със соли на Earle и NaHCO₃ (TCM 199), към която се добавяха FCS или PVA. След стерилно филтриране средата се съхраняваше при температура 4-6° C. За средата съдържаща FCS преди началото на култивирането се добавяха хормоните LH, FSH (FCS среда), а при използване на PVA,

се добавяше и EGF (PVA среда). След етап на промиване в съответната, предварително еквилибрирана среда, култивирането се извършваше в инкубатор при 39,0°C при 5% CO₂ във въздух и максимална влажност. Времето между получаването на яйчниците и началото на инкубацията беше около два часа.

Оценка на състоянието на зреене на ядрото.

Анализите на зрелостта на ядрото се извършваха след 28 и 46 часа *in vitro* матурация. За целта, първоначално се извършваше инкубиране на КОК с 0,25% хиалуронидаза при стайна температура за около 30 секунди. След това яйцеклетките се оголват чрез многократно засмукване и издухване с пипета на Пастър, и се промиваха веднъж в 0,9% разтвор на NaCl. След това се поставяха в капка от 0,9% разтвор на NaCl, поставена върху покривно стъкло. Вазелин-парафинова смес (9 части вазелин + 1 част парафин) се използваше като разделител в ъглите на покривното стъкло. След нанасяне на предметно стъкло, обезмаслено с етанол и внимателно притискане с покривното стъкло, препаратът се фиксира за най-малко 24 часа в разтвор на етанол-ледена оцетна киселина (3 части етанол + 1 част ледена оцетна киселина). След това препаратът първо се оцветяваше с разтвор на ацето-орцеин и се обезцветяваше с 25% оцетна киселина. След оцветяване, се извършваше анализът под фазов контрастен микроскоп при 200-400x увеличение. За всеки експериментален подход по отношение на времето за култивиране (0, 28, 46 часа), двете добавки в средата (FCS и PVA) и различните размери на фоликулите (ГФ и МФ), за оценка на базата на статуса на ядрено съзряване се използваша по 100 яйцеклетки.

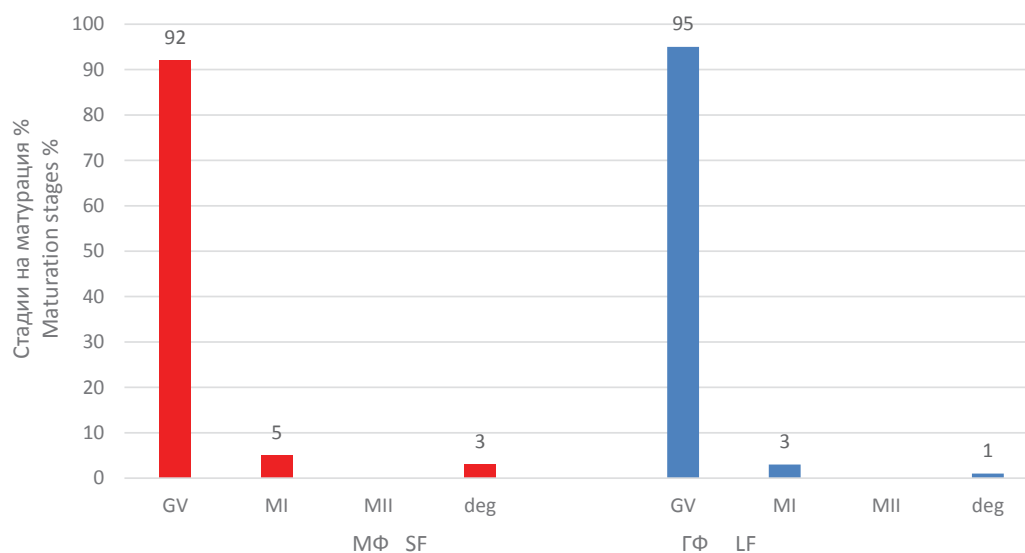
Резултати и обсъждане

Влияние на размера на фоликула върху ядреното съзряване.

Направено беше сравнение на резултатите от ядреното съзряване на ооцити от фолику-

ли с различни размери след IVM в среда съдържаща FCS или PVA. Резултатите са посочени във Фигура 1.

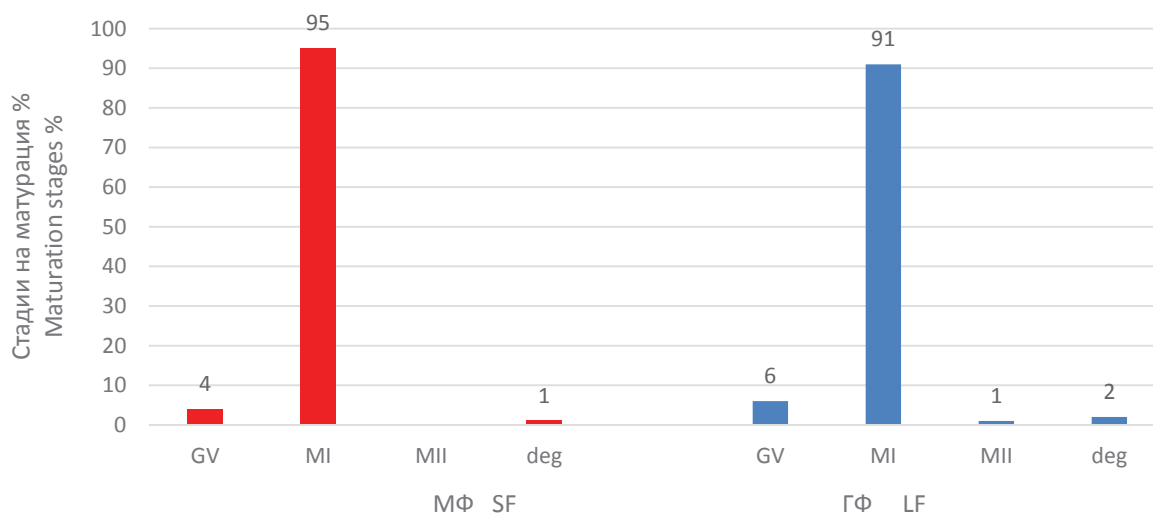
За да се изследва възможното влияние на размера на фоликула върху ядреното съзряване, първо бяха сравнени резултатите от



Фигура 1: Стадии на матурация на ядрото на ооцити получени от малки и големи фоликули и матурирани в продължение на 0 часа в среда с FCS

Figure 1: Stages of nuclear maturation of oocytes obtained from small and large follicles and matured for 0 h in FCS medium

GV – герминален везикул, **MI** – метафаза I, **MII** – метафаза II, **deg** – дегенерирали, **МФ** – малки фоликули, **ГФ** – големи фоликули



Фигура 2: Стадии на матурация на ядрото на ооцити получени от малки и големи фоликули и матурирани в продължение на 28 часа в среда с FCS

Figure 2: Stages of nuclear maturation of oocytes derived from small and large follicles and matured for 28 h in FCS medium

ооцити от МФ и ГФ, култивирани в среда съдържаща FCS, след 0, 28 и 46 часа IVМ. Преди началото на култивирането (0 h)(Фигура 1), 92% от ооцитите от двата класа фоликули бяха в стадий GV и след първата половина на IVМ (28 h).

На Фигура 2 се вижда, че и двете групи са продължили мейозата (МФ: 95%; ГФ : 91%).

В края на култивирането (46 h) (Фигура 3) и двете групи ооцити в повечето случаи завършват мейозата в Метафаза II, като само 83,0% от ооцитите от МФ в сравнение с 94,0% от ГФ достигат този етап. След всеки период на култивиране се наблюдаваше умерен брой от дегенерирани ооцити (1,0–4,0%). χ^2 анализът на ооцитите от двата класа фоликули не показваха статистически значима разлика във всеки един момент.

За да се изследва допълнително възможното влияние на размера на фоликула върху ядреното съзряване, бяха сравнени резултатите от ооцити от МФ и ГФ, култивирани в среда съдържаща PVA, след 0, 28 и 46 часа IVМ. Преди култивиране (0 h), 94% от ооцитите от малки фоликули и 92.0 % от тези от

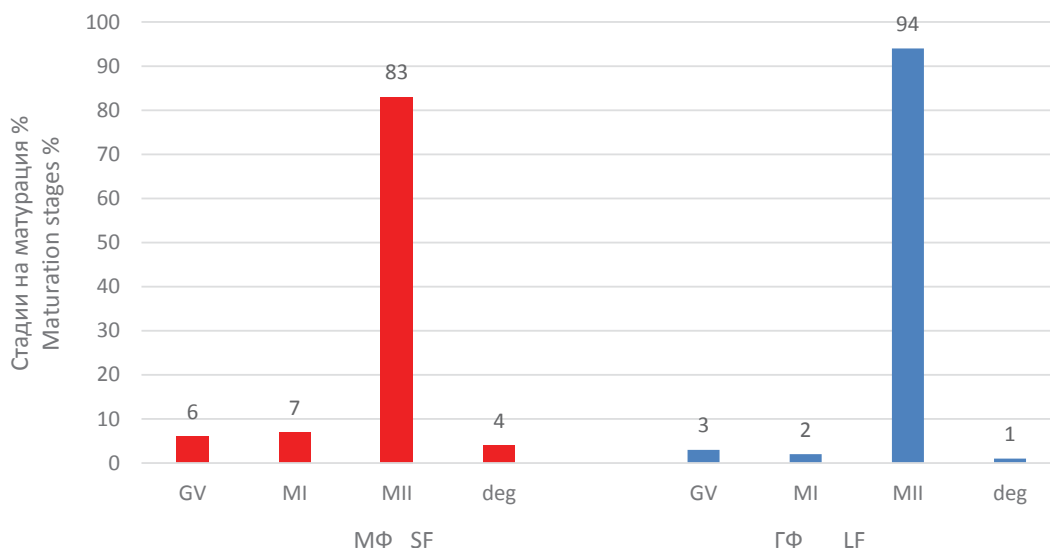
големи фоликули са били в стадий GV (Фигура 4).

След 28 часа 90,0% (МФ) и 92,0% (ГФ) от ооцитите са били в MI стадий на ядрено съзряване (Фигура 5).

По-голямата част от ооцитите от двете групи (МФ 94.0%, ГФ 92.0%) са претърпели мейоза до метафаза II след 46 часа (Фигура 6).

Делът на дегенерирани ооцити варираше между 2,0 и 8,0% в различните периоди на култивиране. Скоростите на ядрената матурация на ооцитите от двата класа фоликули бяха почти еднакви през всичките три времеви пункта. При всички групи не се определи достоверна статистическа разлика.

Тъй като целта на настоящата работа беше да се определи как използването на определени добавки към средите влияе върху компетентността за развитие на ооцити от помалки фоликули в сравнение с ооцити от по-големи фоликули, то фоликулите бяха класифицирани въз основа на техния размер и КОК от тези различни класове фоликули бяха култивирани в среда за матуриране с дефиниран състав или с добавяне на FCS



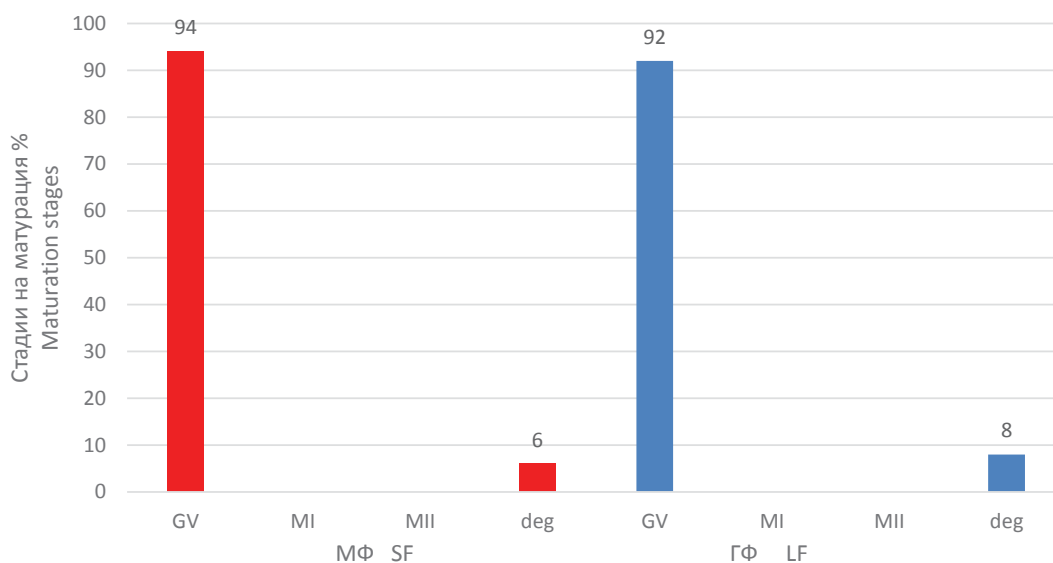
Фигура 3: Стадии на матурация на ядрото на ооцити получени от малки и големи фоликули и матурирани в продължение на 46 часа в среда с FCS

Figure 3: Stages of nuclear maturation of oocytes obtained from small and large follicles and matured for 46 h in FCS medium

или PVA. Въз основа на статуса на ядрената матурация, се определиха връзките между размерите на фоликулите и влиянието на състава на средата върху процесите на интра

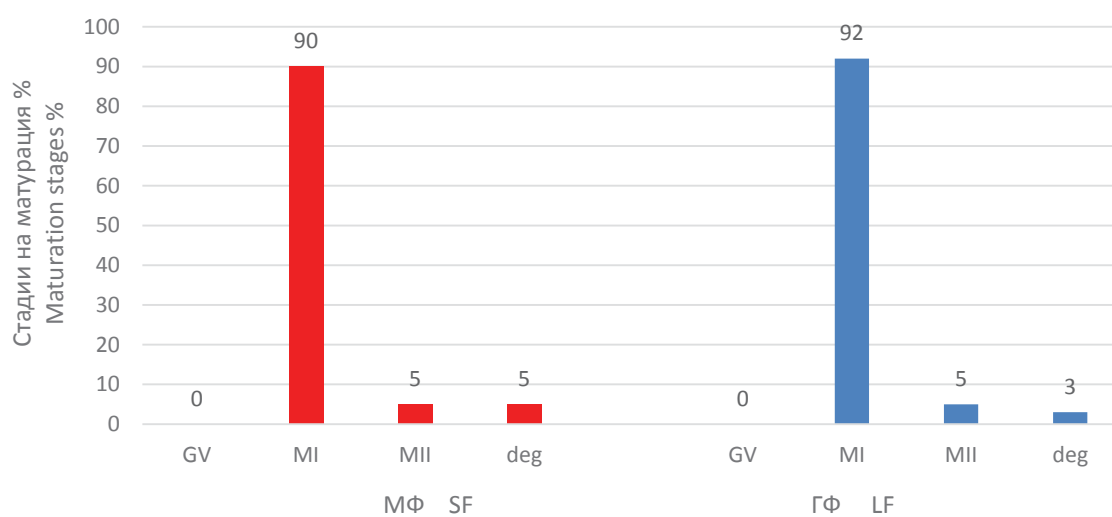
оцитното матуриране и регулаторните механизми.

Класификацията по размер на фоликулите играе основна роля в настоящото изслед-



Фигура 4: Стадии на матурация на ядрото на оцити получени от малки и големи фоликули и матурирани в продължение на 0 часа в среда с PVA

Figure 4: Nuclear maturation stages of oocytes derived from small and large follicles and matured for 0 h in PVA medium



Фигура 5: Стадии на матурация на ядрото на оцити получени от малки и големи фоликули и матурирани в продължение на 28 часа в среда с PVA

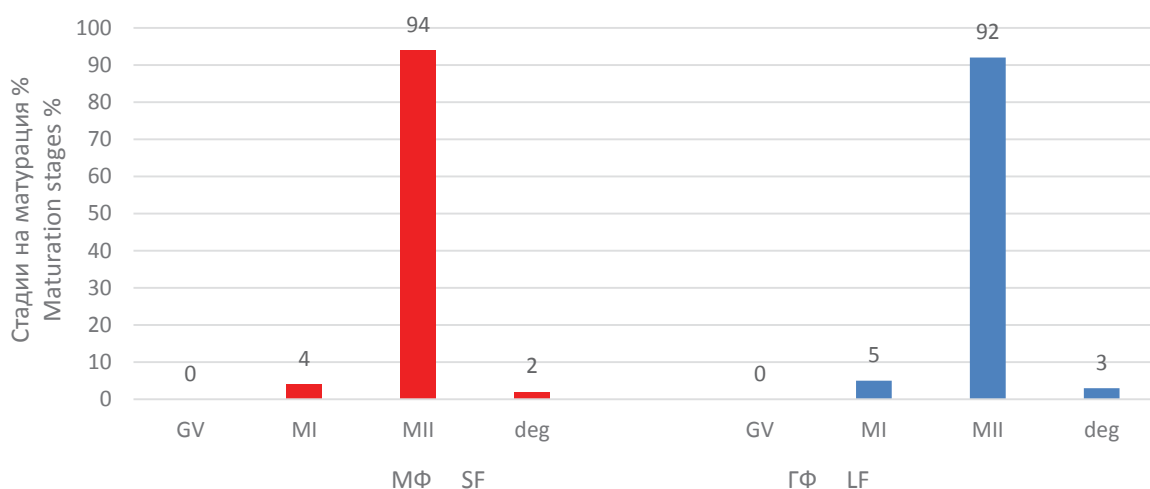
Figure 5: Nuclear maturation stages of oocytes obtained from small and large follicles and matured for 28 h in PVA medium

ване. В повечето научни изследвания фоликулите с максимален диаметър от 3 mm са класифицирани в категорията „малки“. Групата с големи фоликули обикновено включва фоликули с диаметър до 8 mm, въпреки че определението за среден и голям диаметър на фоликулите варира между проучванията (Lee, H.etal., 2017). От класификацията на размера в литературата може да се види, че много малки фоликули често са сравнявани с много големи. Отбелязано е, че свързаните с развитието експериментални резултати варират с увеличаване на разликата в размера между изследваните класове фоликули. Недостатъкът е, че тези много малки и много големи фоликули не представляват фоликулите, които обикновено се използват за IVM, тъй като ооцитите от много малки фоликули нямат достатъчна компетентност за узряване, а много големите фоликули съставляват много малка част от повърхностните фоликули (Shin, H.etal., 2021).

Изборът на диаметри на фоликула от 2–4 mm и 4–6 mm, използвани в настоящото изследване, представлява диапазона, който извън въпроса за влиянието на размера на фо-

ликула се използва при генерирането на КОК за *in vitro* процедурите. Границата между групите фоликули отразява връзката между дела на фоликулите и способността за развитие на ооцитите. Малките фоликули с диаметър 3–4 mm представляват най-голямата част от повърхностните фоликули в предпубертетните яйчници (3 mm - 71,8%, 4 mm - 22,0%, 5–8 mm - 6,2%, n=142 яйчника), но показват намален капацитет за развитие. Поради големия им брой, идентифицирането на техните дефицити в развитието е от особено значение.

Сравнението на етапите на ядрена матурация показва тенденция, ооцитите от МФ в FCS среда да достигат в по-ниска пропорция МII, но тази разлика не е значителна. Не са открити други разлики в скоростите на матуриране на ядрото. Schoevers et al. (2007) успяват да покажат, че добавянето на FSH, който също беше добавен към средата за матуриране в настоящото проучване, доведе до компенсиране на значителните разлики в нивата на МII при фоликули с диаметър 2-3 mm и 5-8 mm. В по-нататъшни проучвания не се открива значителна разлика в скоростите на



Фигура 6: Стадии на матурация на ядрото на ооцити получени от малки и големи фоликули и матурирани в продължение на 46 часа в среда с PVA

Figure 6: Stages of nuclear maturation of oocytes obtained from small and large follicles and matured for 46 hours in PVA medium

ядрената матурация при оцити от фоликули с диаметър 3 mm или повече (Bagg et al. 2009). За разлика от това, Yoon et al., (2000) откриват значителна разлика в нивата на МП между оцитите от малки и големи фоликули, въпреки че тук определената класификация по размер е 3 mm и групата от големи фоликули е избрана в много широк диапазон от 3–8 mm, и това може да обясни несъответствието между техните резултати и тези от настоящото изследване. Съставът на използваната среда за матуриране е от особено значение за оценката на резултатите. Недефинирани добавки в средата, като фоликуларна течност или серум, могат да повлияят на резултатите и да означават, че съществуващите разлики, като напр. при цитоплазматната матурация, между изследваните групи не могат да се дефинират точно. Поради този проблем, с настоящото проучване изследвахме как определена среда за матурация влияе върху матурирането на оцити от фоликули с различни размери. Въз основа на литературни данни, за изследванията беше избран PVA като макромолекулен заместител на FCS (Wrenzycki et al. 1999). За да се компенсира липсата на растежни фактори, съдържащи се в FCS, към PVA средата беше добавен EGF, който насърчава ядрената матурация и деленето (Kishida et al. 2004).

Както в последните споменати проучвания, така и настоящото проучване не показва значителна разлика в скоростите на ядрената матурация между среда без протеини, допълнена с EGF и среда, съдържаща серум или фоликуларна течност. Въпреки това беше интересно, че при използване на среда с PVA, оцитите не остават в GV стадий нито след 28, нито след 46 часа, докато при използване на FCS среда цифрата е около 2-9% (28 часа МФ- 7,2%, n=97, ГФ - 7,6%, n=105; 46 часа МФ - 9,0% n=100, ГФ - 1,9% n=103). Възможно обяснение за това е ефектът на EGF, добавен само към PVA средата. Този подход се подкрепя от проучвания на Kishida et al. (2004), при които EGF води до значително по-нисък дял на оцитите, оставащи в GV стадия, и до

значително по-висок процент на МП при *in vitro* матурирани КОК в сравнение с FSH.

Gruppen et al. (1997) също откриват по-висока степен на прогрес до МП, когато към средата е добавен EGF в присъствието на гонадотропини.

Изводи

Намаления капацитет за развитие на оцитите от малки фоликули показаха, че определената среда за матуриране, въпреки добавянето на EGF, не насърчава оптимално матурирането на оцитите. Въз основа на настоящите резултати могат да бъдат изследвани допълнителни възможности за подобряване на средата за матуриране.

Настоящото проучване показва, че оцитите от по-малки фоликули с дефицити в мейотичната компетентност имат проблеми с матурацията на цитоплазмата, които се потенцират при използването на определена среда. Установено беше, че КОК от МФ под въздействието на FCS показват по-силна лутеинизация в сравнение с КОК от ГФ, но това може да бъде компенсирано чрез използване на среда за матуриране без серум.

Благодарност: Това изследване е подкрепено от Министерство на образованието и науката по Национална програма „Млади учени и постдокторанти – 2“.

Литература

Bagg, M. A., Nottle, M. B., Armstrong, D. T. & Gruppen, C. G. (2009). Effect of follicle size and dibutyryl cAMP on the cAMP content and gap junctional communication of porcine prepubertal cumulus-oocyte complexes during IVM. *Reproduction Fertility and Development*, 21, 796–804

Gruppen, C. G., Nagashima, H. & Nottle, M. (1997). Role of epidermal growth factor and insulin-like growth factor-I on porcine oocyte maturation and embryonic development *in vitro*. *Reproduction Fertility and Development*, 9, 571–575

- Lee, H., Elahi, F., Lee, J., Lee, S. T., Hyun, S. H. & Lee, E. (2017). Supplement of cilostamide in growth medium improves oocyte maturation and developmental competence of embryos derived from small antral follicles in pigs. *Theriogenology*, 91, 1–8.
- Lonergan, P. & Fair, T. (2016). Maturation of oocytes in vitro. *Annu Rev Anim Bioscience*, 4, 255–268.
- Lucas, X., Martínez, E. A., Roca, J., Vázquez, J. M., Gil, M. A., Pastor, L. M. & Alabart, J. L. (2002). Relationship between antral follicle size, oocyte diameters and nuclear maturation of immature oocytes in pigs. *Theriogenology*, 58, 871–885.
- Prather, R. S. (2013). Pig genomics for biomedicine. *Nature Biotechnology*, 31, 122–124.
- Kishida, R., Lee, E. S. & Fukui, Y. (2004). In vitro maturation of porcine oocytes using a defined medium and developmental capacity after intracytoplasmic sperm injection. *Theriogenology*, 62, 1663–1676.
- Sánchez, F. & Smitz, J. (2012). Molecular control of oogenesis. *Biochim Biophys Acta*, 1822, 1896–1912.
- Sela-Abramovich, S., Edry, I., Galiani, D., Nevo, N. & Dekel, N. (2006). Disruption of gap junctional communication within the ovarian follicle induces oocyte maturation. *Endocrinology*, 147, 2280–2286.
- Shin, H., Lee, Y., Lee, J., Lee, S. T., Lee, G. S. & Lee, E. (2021). In vitro growth culture in a medium with reduced sodium chloride improves maturation and developmental competence of pig oocytes derived from small antral follicles. *Theriogenology*, 165, 37–43.
- Schoevers, E. J., Colenbrander, B. & Roelen, B. A. J. (2007). Developmental stage of the oocyte during antral follicle growth and cumulus investment determines in vitro embryo development of sow oocytes. *Theriogenology*, 67, 1108–1122.
- Vaccari, S., Weeks, J. L., Hsieh, M., Menniti, F. S. & Conti, M. (2009). Cyclic GMP signaling is involved in the luteinizing hormone-dependent meiotic maturation of mouse oocytes. *Biology of Reproduction*, 81, 595–604.
- Wigglesworth, K., Lee, K. & Peng, J. (2013). Bidirectional communication between oocytes and ovarian follicular somatic cells is required for meiotic arrest of mammalian oocytes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 110, 3723–3729.
- Whitworth, K. M., Kebo, L., Benne, J., Beaton, B., Spate, L. & Murphy, S. (2014). Use of the CRISPR/Cas9 system to produce genetically engineered pigs from in vitro-derived oocytes and embryos. *Biology of Reproduction*, 91, 78.
- Wrenzycki, C., Herrmann, D., Carnwath, J. W. & Niemann, H. (1999). Alterations in the relative abundance of gene transcripts in preimplantation bovine embryos cultured in medium supplemented with either serum or PVA. *Molecular Reproduction and Development*, 53, 8–18.
- Yamashita, Y., Okamoto, M. & Kawashima, I. (2011). Positive feedback loop between prostaglandin E2 and EGFl-like factors is essential for sustainable activation of MAPK3/1 in cumulus cells during in vitro maturation of porcine cumulus oocyte complexes. *Biology of Reproduction*, 85, 1073–1082.
- Yoon, K. W., Shin, T. S., Park, J. I., Roh, S., Lim, J. M., Lee, B. C., Hwang, W. S. & Lee, E. S. (2000). Development of porcine oocytes from preovulatory follicles of different sizes after maturation in media supplemented with follicular fluids. *Reproduction Fertility and Development*, 12, 133–139.

Received: August, 12, 2023; Approved: August, 21, 2023; Published: October, 2023