

Ефект на кумулусните клетки върху витрификацията на матурирани говежди ооцити

Цветелина Тодорова

*Институт по животновъдни науки, 2230 – Костинброд, България,
Селскостопанска академия, София
Кореспонденция: tzvetelinata@yahoo.com*

Резюме

За да се прилага най-добрият протокол за витрификация трябва да се минимизират щетите, които претърпяват ооцитите по време на процеса и да се постигне по-висок процент на преживяемост и развитие. За реализиране на тази цел е необходимо да се определи и ефектът на кумулусните клетки по време на витрификация на матурирани говежди ооцити. Степента на преживяемост на свежи ооцити е много близо до 100% без значителни разлики между групите. Въпреки това степента на преживяемост на витрифицирани денудирани ооцити (вДО) в групите (91,0%) и витрифицирани денудирани ооцити с кумулусни клетки (вДО + кк) (93%) са по-високи от витрифицираните кумулусно-ооцитни комплекси (КОК) (79,6%), $P < 0,05$. Витрифицираните кумулусно-ооцитни комплекси имат значително по-ниски нива на преживяемост (79,6%) в сравнение с техните свежи аналози (97,3%) съответно ($P < 0,05$).

Нашите резултати показват, че е препоръчително да се отстранят поне част от кумулусните клетки преди витрификацията на матурирани говежди ооцити. Денудираните ооцити преживяват витрификация с по-висока скорост от кумулусно-ооцитните комплекси, въпреки че тяхното оплождане и последващо развитие на ембриони са компрометирани поради липсата на кумулусни клетки. Добавянето на интактни кумулусни клетки (КК) може да възстанови ситуацията, осигурявайки на денудираните ооцити подобни скорости на оплождане и развитие на ембрионите, като при витрифицираните кумулусно-ооцитни комплекси.

Ключови думи: *in vitro*, говеда, витрификация, ооцити, кумулусни клетки

Effect of cumulus cells on vitrification of matured bovine oocytes

***Tsvetelina Todorova**

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

*Corresponding author: tzvetelinata@yahoo.com

Citation: Todorova, T. (2023). Effect of cumulus cells on vitrification of matured bovine oocytes. *Zhivotnovadni Nauki*, 60(1), 4-12 (Bg).

Abstract

In order to implement the best vitrification protocol one must minimize the damage that the oocytes suffer during the process and achieve a higher rate of survival and development. To realize this goal,

it is necessary to determine the effect of cumulus cells during vitrification of matured bovine oocytes. The survival rate of fresh oocytes was very close to 100%, with no significant differences between groups. However, the survival rates of vitrified denuded oocytes (vDO) in groups (91.0%) and vitrified denuded oocytes with cumulus cells (vDO + cc) (93%) were higher than vitrified cumulus-oocyte complexes (COC) (79.6%), $P < 0.05$. Vitrified COCs had significantly lower survival rates (79.6%) compared to their fresh counterparts 97.3% respectively, ($P < 0.05$).

Our results indicate that it is advisable to remove at least some of the cumulus cells before vitrification of matured bovine oocytes. Denuded oocytes undergo vitrification at a higher rate than cumulus-oocyte complexes, although their fertilization and subsequent embryo development are compromised due to the lack of cumulus cells. Addition of intact COCs can restore the situation, providing denuded oocytes with similar rates of fertilization and embryo development as vitrified COCs.

Key words: *in vitro*, bovine, vitrification, oocytes, cumulus cells

Въведение

Криоконсервацията на ооцити и ембриони е важен елемент от асистираните репродуктивни технологии, тъй като позволява запазване на ценен генетичен материал за по-дълъг период от време. Двата основни метода за криоконсервация са чрез *конвенционално бавно замразяване* (Whittingham et al., 1972) и чрез *витрификация* (Rall and Fahy, 1985). Massip et al. (1987) описват витрификацията като втвърдяване на течност, постигнато чрез екстремно повишаване на вискозитета по време на охлаждане, така че разтворът да се превърне в „стъкло“. Те съобщават за раждането на две женски телета след трансфер на витрифицирани / размразени ембриони. Това е първият път, когато след витрифициране на ембриони от говеда, последвано от ембриотрансфер е получено нормално потомство. Въпреки че криоконсервацията на говежди ооцити остава предизвикателство, някои от най-окуражаващите резултати сред домашните животни са получени при говеда, при които е получено потомство от незрели и зрели витрифицирани ооцити след *in vitro* оплождане (IVF) и *in vitro* култивиране (IVC) (Vieira et al., 2002). Vajta (1998) съобщава за получени 25% процента бластоцисти на 8-ия ден след витрификация с помощта на open pulled straw (OPS), размразяване, *in vitro* оплождане и *in vitro* култивиране. Ооцитите от говеда на стадий герминален везикул (GV)

имат хомогенни липидни капчици, които показват малка промяна след охлаждане, но техният голям размер и ниското съотношение повърхност/обем затрудняват движението на водата и криопротекторите през плазмената мембрана (Seidel et al., 2006).

Един от основните проблеми, свързани с криоконсервацията на говежди ооцити, е източникът. По-голямата част от ооцитите се получават от яйчници, получени в клиниката, което представлява проблем. Ооцитите са получени от фоликули с различни размери, което означава, че са в различни етапи на развитие и понасят замразяването в различна степен. Другият проблем с този източник е фактът, че последващото съзряване настъпва *in vitro*, за разлика от *in vivo*, което също влияе върху толерантността на замразяване на ооцитите.

За получаване на бластоцисти, подходящи за витрификация се използват само качествени ооцити. Доказано е, че ооцитите, узрели *in vivo*, имат значително по-висока скорост на съзряване и образуване на бластоцисти от тези, узрели *in vitro* (Rizos et al., 2002). Освен това е доказано, че частичното отстраняване на кумулусните клетки няколко часа след началото на матуриране *in vitro* (IVM) може да улесни проникването на криопротекторите (Tashima et al., 2017).

Въпреки постигнатия голям напредък, витрификацията на матурирани говежди ооцити остава предизвикателство, тъй като

след размразяване тяхното оцеляване и развитие са компрометирани. За да се прилага най-добрият протокол за витрификация трябва да се минимизират щетите, които ооцитите претърпяват по време на процеса и да се постигне по-висок процент на преживяемост и развитие. За реализиране на тази цел е необходимо да се определи и ефектът на кумулусните клетки по време на витрификация на матурирани говежди ооцити.

Материали и методи

Получаване на кумулусно-ооцитните комплекси

Кумулусно-ооцитните комплекси (КОК) бяха получени от яйчници от заклани животни чрез пунктиране на фоликули с размер от 4 до 8 милиметра с помощта на спринцовка и игла с размер 18G. Фоликулярната течност беше събрана в 50 ml конични центрофужни епруветки, в които предварително беше поставена около 2 ml модифицирана Паркър среда (Modified Parker's Medium-MPM) с добавка от 20% фетален телешки серум (FCS). След 10 до 15 минути седимента беше изсмукал с помощта на пастъорова пипетка и поставен в малка петриева паничка с около 3 ml MPM + 20% FCS. За *in vitro* матурация бяха отделени само ооцити с компактен кумулус и повече от три слоя клетки, ооплазма с фини и хомогенни гранули, изпълващи вътрешността на *zona pellucida* и кафяв цвят.

In vitro матурация

Матурацията беше извършена в модифицирана Паркър среда с добавка на 20% декомплементиран (56 °C, 30 минути) естрален серум (ECS) и 2 mg/ml фоликулостимулиращ хормон (FSH). Преди започване на матурацията, матурационната среда беше еквилибрирана два до три часа при 39 °C, 5% CO₂ и максимална влажност на въздуха. За матуриране бяха използвани плаки с 4 ямки (Nunc). Във всяка ямка беше поставена 400 µl среда, покрита с 400 µl течен парафин. В една ямка бяха матурирани от 20 до 40 кумулусно-ооцитни ком-

плекса. Матурацията бе извършва при 39 °C, 5% CO₂ във въздух с максимална влажност в продължение на 24 часа.

Витрификация и размразяване

In vitro матурираните говежди ооцити бяха витрифицирани с някои модификации, както е описано от Kuwayama et al. (2005). Използваната среда за манипулиране (CM) беше TCM199 с добавен 20% фетален телешки серум (FCS). Тази среда е базова за приготвяне на всички среди за витрифициране. Етапите на витрификация и размразяване бяха извършвани при 38,5 °C, върху затоплена повърхност.

Витрификацията беше извършвана на два етапа: еквилибриране и витрификация. Ооцитите бяха еквилибрирани чрез прехвърлянето им последователно в три капки от 75 µl среда за еквилибриране (CE), съставена от среда за манипулиране с добавени 7,5% етиленгликол (EG) и 7,5% диметил-сулфоксид (DMSO). След като ооцитите възвърнаха първоначалния си обем, те бяха прехвърляни в четири последователни 50 µl капки от среда за витрифициране (CB), съставена от средата за манипулиране (CM) с добавени 15% EG, 15% DMSO и 0,5 M захароза. Ооцитите бяха поставени в средата за еквилибриране за 10–15 минути и в средата за витрификация за 45–60 секунди. След замразяване и престояване една седмица в течен азот (LN₂) ооцитите бяха размразени чрез прехвърлянето им в затопляща среда, съставена от среда за манипулиране с 1 M захароза. Това беше последвано от тристепенно промиване на хиперосмоларната захароза, намалена от 1 M на 0,5 M (първо промиване за 3 минути), 0,25 M (второ промиване за 5 минути) и 0 M в среда за манипулиране (трето промиване за 5 минути). Ооцитите бяха промивани в среда за манипулиране три пъти и след това бяха инкубирани в среда за зреене в продължение на 2 часа, за да им се даде възможност да се възстановят.

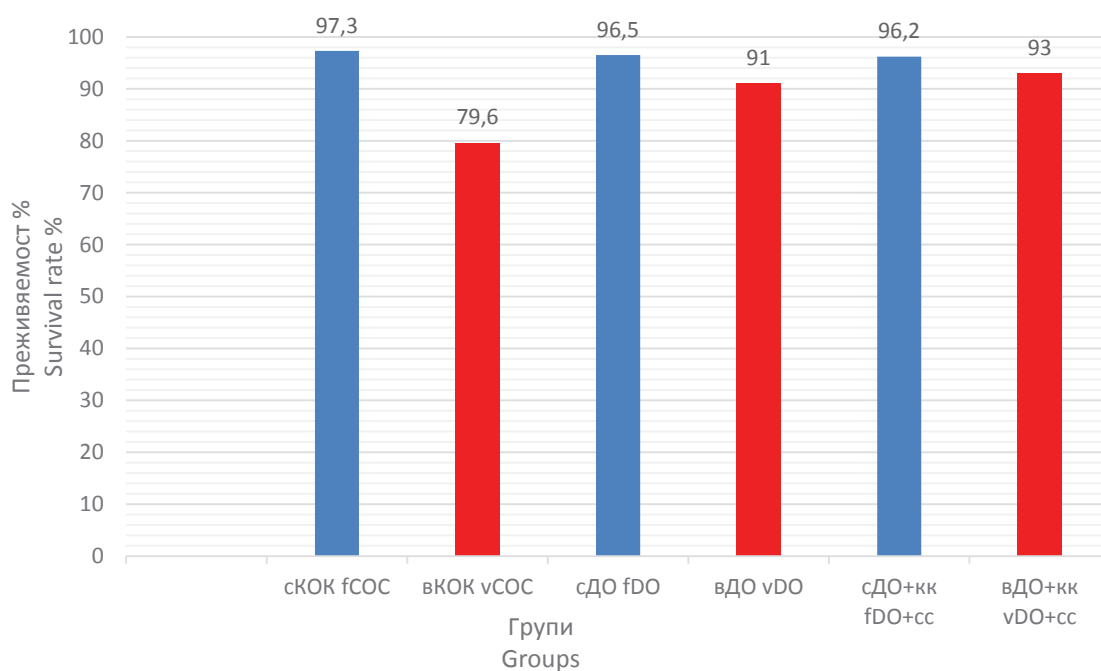
In vitro оплождане и *in vitro* култивиране

Свежи ооцити (невитрифицирани) и витрифицирани ооцити бяха оплодени при

еднакви условия със замразена-размразена семенна течност от бик. Крайната концентрация на сперматозоиди от 1×10^6 сперматозоиди/ml беше коригирана със средата за оплождане Tyrode's albumin-lactate-pyruvate (TALP), състояща се от буферизиран с бикарбонат разтвор на Tyrode, допълнен с говежди серум албумин (BSA) (6 mg/ml) и хепарин (25 mg/ml). На 21 час след *in vitro* оплождането кумулусните клетки на предполагаемите зиготи бяха отстранени, промити и култивирани в групи от 25 в 50 μ l капки от Synthetic oviductal fluid medium (SOF), допълнена с 0,4% говежди серум албумин. Култивирането бе извършено в инкубатор при 39 °C във въздух с 5% CO при максимална влажност. Степента на разделяне беше определена 48 часа след оплождането, а развитието до стадий бластоцист на 8-и ден.

Резултати и обсъждане

В експеримента матурираните говежди ооцити ($n = 1200$), бяха разделени на случаен принцип в две групи – свежи и витрифицирани. Свежите ооцити също бяха разделени на три групи: свежи кумулусно-ооцитни комплекси (сКОК), свежи оголени (денудирани) ооцити (сДО) и свежи оголени ооцити с добавени кумулусни клетки по време на оплождане (сДО + кк). Ооцитите във витрифицираната група също бяха разделени на три групи след затопяне: витрифицирани кумулусно-ооцитни комплекси (вКОК), витрифицирани денудирани ооцити (вДО) и витрифицирани денудирани ооцити с добавени кумулусни клетки по време на оплождане (вДО + кк). Интактните кумулусни клетки (КК), които бяха добавени към витрифицираните ооци-



вКОК – витрифицирани кумулусно-ооцитни комплекси
вДО – витрифицирани денудирани ооцити
вДО+кк – витрифицирани денудирани ооцити с кумулусни клетки
сКОК – свежи кумулусно-ооцитни комплекси
сДО – свежи денудирани ооцити
сДО + кк – свежи денудирани ооцити с кумулусни клетки

Фиг. 1. Нива на преживяемост на ооцитите

Fig. 1. Survival rate of the oocytes

ти по време на оплождането, бяха получени един ден преди размразяването и култивирани при същите условия като останалите ооцити. Кумулусните клетки бяха отстранени чрез пипетиране след оплождането и преди преценка на преживяемостта, разделянето и достигане на стадий бластоцист.

Степента на преживяемост на групите от свежи ооцити беше много близо до 100%, без значителни разлики между групите (фигура 1).

Въпреки това степента на преживяемост на витрифицирани денудирани ооцити (вДО) в групите (91,0%) и витрифицирани денудирани ооцити с кумулусни клетки (вДО + кк) (93%) беше по-висока от витрифицираните КОК (79,6%) ($P < 0,05$).

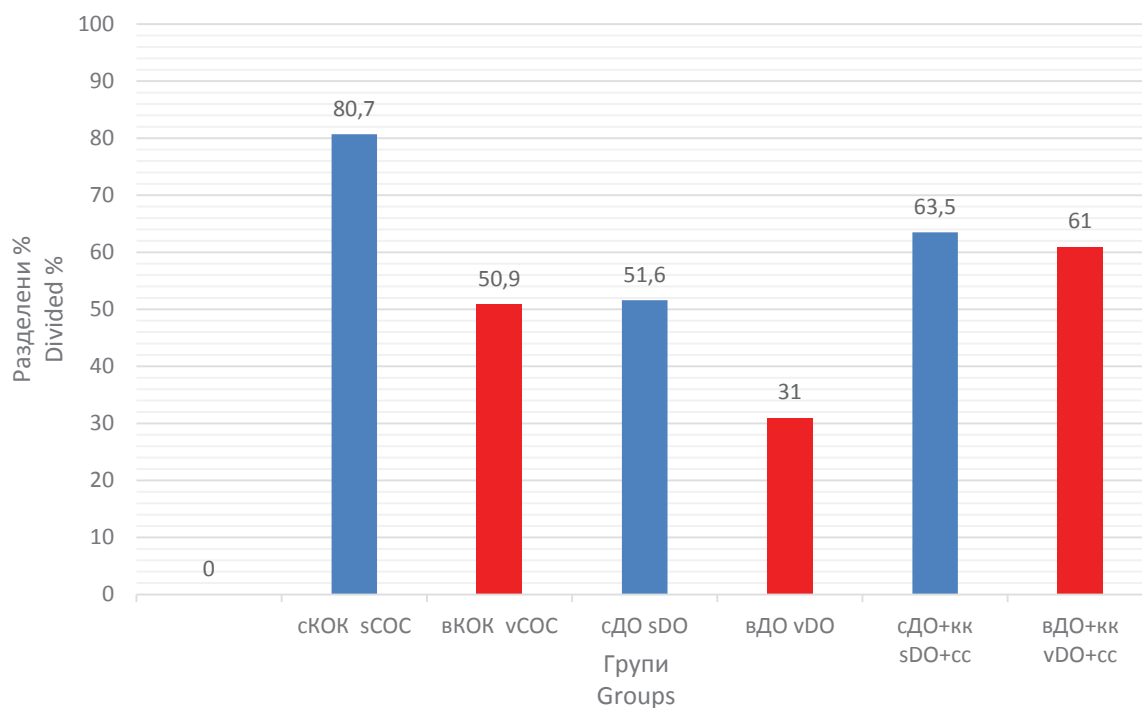
Витрифицираните кумулусно-ооцитни комплекси имат значително по-ниски нива на преживяемост (79,6%) в сравнение с техните свежи аналози (97,3%) ($P < 0,05$).

Отстраняването на кумулусните клетки след матуриране значително намалява броя

на разделените ооцити ($P < 0,05$). Въпреки това увеличението на степента на разделяне е по-голямо при свежите денудирани ооцити с кумулусни клетки (сДО + кк) в сравнение със свежите денудирани ооцити (сДО) (63,5% срещу 51,6% съответно, $P < 0,05$). Същият ефект беше наблюдаван сред витрифицираните групи ($P < 0,05$) (фигура 2).

Добавянето на кумулусни клетки към витрифицирани денудирани ооцити (вДО + кк) води до степени на делене, сравними с тези при витрифицирани кумулусно-ооцитни комплекси (съответно 61,0% срещу 50,9% респективно). Степента на разделяне на витрифицирани кумулусно-ооцитни комплекси (вКОК) (50,9%) и витрифицирани денудирани ооцити (вДО) (31,0%) е значително по-ниска от свежите кумулусно-ооцитни комплекси (сКОК) (80,7%) и свежите денудирани ооцити (сДО) (51,6%), $P < 0,05$.

Шансовете да се развият до бластоцисти са по-големи при свежи кумулусно-ооцитни комплекси (сКОК) (40,0%) и свежи дену-



Фиг. 2. Степен на разделяне след оплождане

Fig. 2. Development rate after fertilization

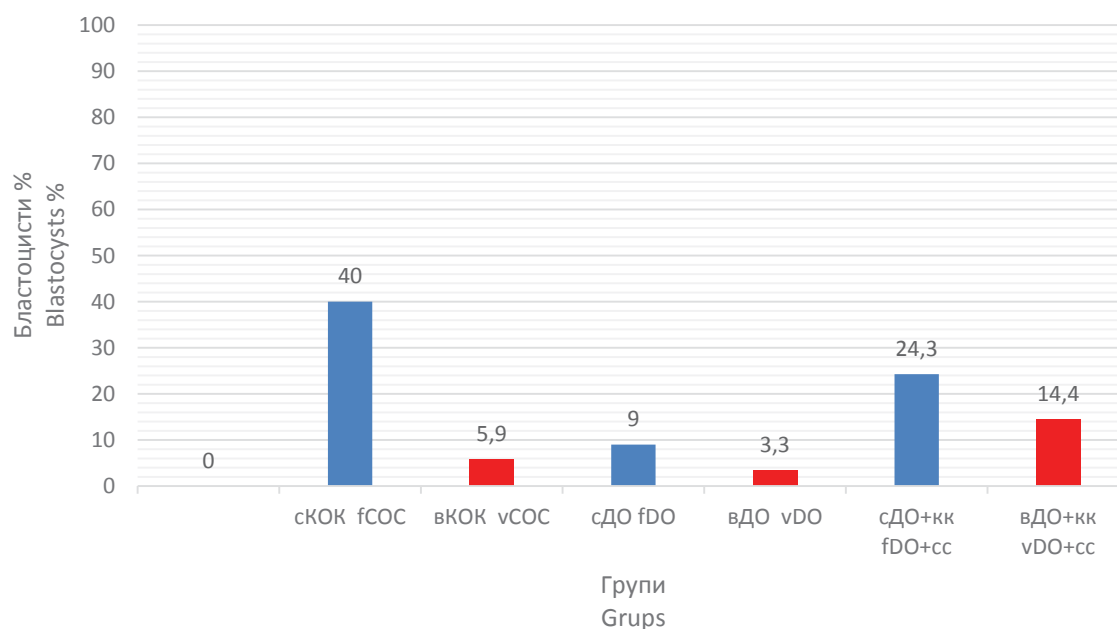
дирани ооцити с добавени кумулусни клетки (сДО + кк) (24,3%) в сравнение с витрифицирани кумулусно-ооцитни комплекси (вКОК) (5,9%) и витрифицирани денудирани ооцити с добавени кумулусни клетки (вДО + кк) (14,4%), $P < 0,05$. Сред витрифицираните групи наблюдавахме, че отстраняването на кумулусните клетки не оказва значителен ефект върху развитието до бластоцист на витрифицирани денудирани ооцити (вДО) (3,3%) в сравнение с витрифицирани кумулусно-ооцитни комплекси (вКОК) (5,9%), но процентът на развитие до бластоцисти при витрифицирани денудирани ооцити с добавени кумулусни клетки (вДО + кк) е значително по-висок в сравнение с витрифицираните денудирани ооцити (вДО) (14,4% срещу 3,3% съответно, ($P < 0,05$) (фигура 3).

Отстраняването на кумулусните клетки преди оплождането има отрицателен ефект върху скоростта на развитие (фигура 4).

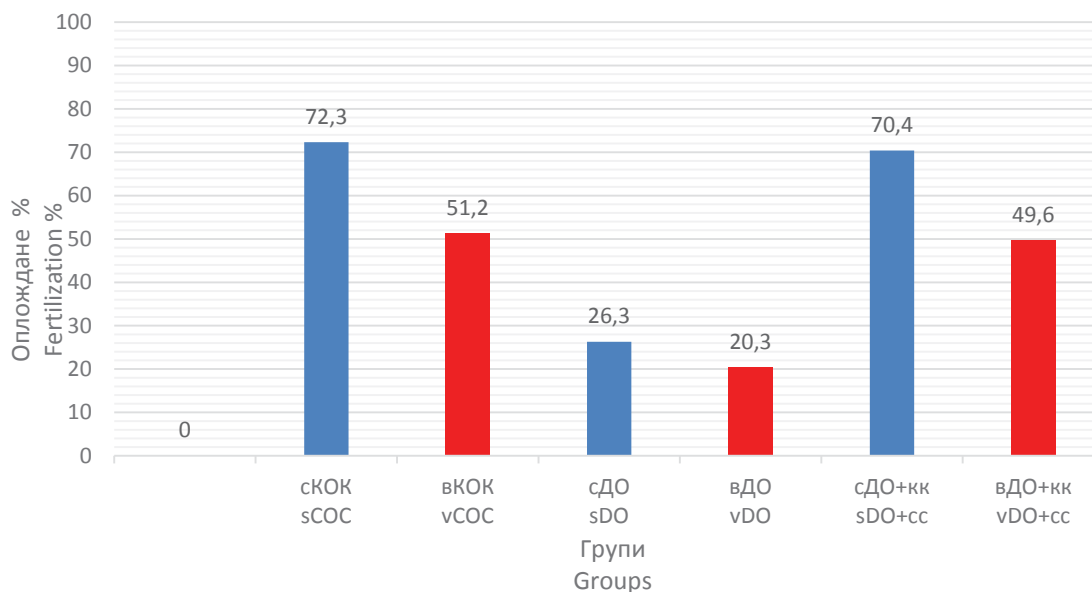
При свежите ооцити степента на оплождане на денудирани ооцити (сДО) (26,3%) беше значително по-ниска в сравнение със свежи-

те кумулусно-ооцитни комплекси (сКОК) (72,3%) ($P < 0,05$). Добавянето на непокътнати свежи кумулусни клетки към свежи денудирани ооцити (сДО) може да повлияе степента на оплождане, до степен да не се различава значително от свежите кумулусно-ооцитни комплекси (сКОК) (72,3% срещу 70,4 % съответно). Същият ефект беше наблюдаван и при витрифицирани ооцити. Степента на оплождане беше значително по-висока за витрифицираните кумулусно-ооцитни комплекси (вКОК) в сравнение с витрифицирани денудирани ооцити (вДО) (51,2% срещу 20,3% съответно ($P < 0,05$) и ситуацията може да бъде обрната, когато вДО са допълнени с непокътнати кумулусни клетки (вДО + кк, 49,6%), ($P < 0,05$).

Ефектът на кумулусните клетки по време на витрификацията е изследван от много автори в продължение на години, но при няколко вида са получени противоречиви резултати. При хората в началото се наблюдава благоприятен ефект на кумулусните клетки върху оцеляването на матурирани ооцити (Kuwayama et al., 2005), но Paul et al.



Фиг. 3. Развитие на оплодени ооцити до стадий бластоцист
Fig. 3. Development of fertilized oocytes to blastocyst



Фиг. 4. Степен на оплождане

Fig. 4. Fertilization rate

(2018) не съобщават за разлики в преживяемостта на кумулузно-ооцитни комплекси в сравнение с денудирани ооцити. При коне е установено, че наличието на кумулузни клетки е от полза по време на витрификацията на *in vitro* матурирани ооцити (Zhang et al., 2020), докато Gasparrini et al. (2007) съобщават, че те играят вредна роля по време на витрификацията на биволски ооцити. От друга страна, не са открити разлики в степента на преживяемост между кумулузно-ооцитните комплекси и денудирани ооцити от овце (Zhang et al., 2009). При говеда са докладвани противоречиви резултати. Chinen et al. (2020) не наблюдават никакъв ефект, когато кумулузните клетки присъстват по време на витрификацията на говежди ооцити. По същия начин Zhang et al. (2020) не наблюдават никакъв ефект върху оцеляването на матурирани говежди ооцити, когато те са витрифицирани с кумулузни клетки. Нашите наблюдения са в унисон с последното изследване. Предполага се, че кумулузните клетки може да възпрепятстват дифузията на вода и криопротектант, което води до неадекватна клетъчна защи-

та. Трябва да се отбележи, че денудирани ооцити са по-лесни за манипулиране, когато се използва криотоп по време на витрификация (Tashima et al., 2017). Освен това количеството течност около тези ооцити е по-малко в сравнение с кумулузно-ооцитните комплекси. По-малко количество течност около ооцита води до по-висока скорост на охлаждане и затопляне (Sinha et al., 2014), което може да бъде положително за оцеляването на денудирани ооцити в сравнение с кумулузно-ооцитните комплекси (Somfai and Hirao, 2021).

Известно е, че отстраняването на кумулузните клетки малко преди *in vitro* оплождане (IVF) силно намалява степента на оплождане при говедата (Dujíčková et al., 2021). По време на оплождането кумулузните клетки привличат, улавят и селектират сперматозоидите. Те са важни за индуциране на капацицията на сперматозоидите, акрозомната реакция, пенетрацията и за предотвратяване на втвърдяването на *zona pellucida*. В проведенния експеримент отстраняването на кумулузните клетки след *in vitro* матурация намали скоростта на развитие, разделяне и дости-

гане до стадий бластоцист. За да се разреши този проблем, по време на оплождането към денудирани ооцити (ДО) бяха добавени интактни кумулусни клетки. По този начин денудирани ооцити може да възстановят способността си за развитие (Tashima, et al., 2017). Zhang et al. (2020) показват, че скоростта на разделяне на витрифицирани биволски ооцити се увеличава, когато денудирани ооцити се допълват с интактни кумулусни клетки, но не и при развитието до бластоцисти.

Друг начин за разрешаване на негативния ефект на кумулусните клетки по време на витрификацията и за допускане на положително влияние по време на оплождането включва частично намаляване на кумулусните клетки преди витрификацията (Dujíčková et al. 2021).

Изводи

Нашите резултати показват, че е препоръчително да се отстранят поне част от кумулусните клетки преди витрификацията на матурирани говежди ооцити. Денудирани ооцити преживяват витрификация с по-висока скорост от кумулусно-ооцитните комплекси, въпреки че тяхното оплождане и последващо развитие на ембриони са компрометирани поради липсата на кумулусни клетки. Добавянето на интактни кумулусни клетки може да възстанови ситуацията, осигурявайки на денудирани ооцити подобни скорости на оплождане и развитие на ембрионите като при витрифицираните кумулусно-ооцитни комплекси.

Литература

Chinen, S., Yamanaka, T., Hirabayashi, M., & Hochi, S. (2020). Rescue of vitrified-warmed bovine mature oocytes by short-term recovery culture with resveratrol. *Cryobiology*, 97, 185-190.

Dujíčková, L., Makarevich, A. V., Olexiková, L., Kubovičová, E., & Strejček, F. (2021). Methodologi-

cal approaches for vitrification of bovine oocytes. *Zygote*, 29(1), 1-11.

Gasparrini, B., Attanasio, L., De Rosa, A., Monaco, E., Di Palo, R., & Campanile, G. (2007). Cryopreservation of in vitro matured buffalo (*Bubalus bubalis*) oocytes by minimum volumes vitrification methods. *Animal Reproduction Science*, 98(3-4), 335-342.

Kuwayama, M., Vajta, G., Kato, O., & Leibo, S. P. (2005). Highly efficient vitrification method for cryopreservation of human oocytes. *Reproductive biomedicine online*, 11(3), 300-308.

Massip, A., Van Der Zwalm, P., & Ectors, F. (1987). Recent progress in cryopreservation of cattle embryos. *Theriogenology*, 27(1), 69-79.

Paul, A. K., Liang, Y., Srirattana, K., Nagai, T., & Parnpai, R. (2018). Vitrification of bovine matured oocytes and blastocysts in a paper container. *Animal Science Journal*, 89(2), 307-315.

Rall, W. F., & Fahy, G. M. (1985). Ice-free cryopreservation of mouse embryos at -196 C by vitrification. *Nature*, 313(6003), 573-575.

Rizos, D., Ward, F., Duffy, P. A. T., Boland, M. P., & Lonergan, P. (2002). Consequences of bovine oocyte maturation, fertilization or early embryo development in vitro versus in vivo: implications for blastocyst yield and blastocyst quality. *Molecular reproduction and development*, 61(2), 234-248.

Seidel Jr, G. E. (2006). Modifying oocytes and embryos to improve their cryopreservation. *Theriogenology*, 65(1), 228-235.

Sinha, R., Kharche, S. D., Sinha, N. K., Goel, A. K., Jindal, S. K., & Sonia, S. (2014). Effect of vitrification and slow freezing on in-vitro matured prepubertal goat oocytes. *Indian Journal of Animal Sciences*, 84(3), 289-292.

Somjai, T., & Hirao, Y. (2021). Vitrification of immature bovine oocytes in protein-free media: The impact of the cryoprotectant treatment protocol, base medium, and ovary storage. *Theriogenology*, 172, 47-54.

Tashima, K., Kubo, Y., Hirabayashi, M., & Hochi, S. (2017). Downsizing cumulus cell layers to improve cryotolerance of germinal vesicle-stage bovine oocytes. *Theriogenology*, 95, 1-7.

Vajta, G., Holm, P., Kuwayama, M., Booth, P. J., Jacobsen, H., Greve, T., & Callesen, H. (1998). Open pulled straw (OPS) vitrification: a new way to reduce cryoinjuries of bovine ova and embryos. *Molecular Reproduction and Development: Incorporating Gamete Research*, 51(1), 53-58.

Vieira, A. D., Mezzalira, A., Barbieri, D. P., Lehmkuhl, R. C., Rubin, M. I. B., & Vajta, G. (2002). Calves born after open pulled straw vitrification of immature bovine oocytes. *Cryobiology*, 45(1), 91-94.

Whittingham, D. G., Leibo, S. P., & Mazur, P. (1972). Survival of mouse embryos frozen to -196 and -269°C. *Science*, *178*(4059), 411-414.

Zhang, J., Nedambale, T. L., Yang, M., & Li, J. (2009). Improved development of ovine matured oocyte following solid surface vitrification (SSV): effect of cumulus cells and cytoskeleton stabilizer. *Animal reproduction science*, *110*(1-2), 46-55.

Zhang, F., Zhang, Z. Y., Cai, M. D., Li, X. X., Li, Y. H., Lei, Y., & Yu, X. L. (2020). Effect of vitrifica-

tion temperature and cryoprotectant concentrations on the mRNA transcriptome of bovine mature oocytes after vitrifying at immature stage. *Theriogenology*, *148*, 225-235.

Zhou, X. L., Al Naib, A., Sun, D. W., & Lonergan, P. (2010). Bovine oocyte vitrification using the Cryotop method: effect of cumulus cells and vitrification protocol on survival and subsequent development. *Cryobiology*, *61*(1), 66-72.