

dr hab. Ewelina Warzych,

dr hab. Piotr Pawlak,

prof. dr hab. Dorota
Lechniak✉

Katedra Genetyki i Podstaw Hodowli Zwierząt, Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu

https://doi.org/10.18388/pb.2021_412

✉ autor korespondujący: dorota.cieslak@up.poznan.pl

Słowa kluczowe: jakość, krople lipidowe, kwasy tłuszczowe, biomarker, rozród, *in vitro*

Wykaz stosowanych skrótów: IVP (ang. *in vitro embryo production*) – pozyskiwanie zarodków *in vitro*; COC (ang. *cumulus oocyte complex*) – kompleks oocyt – komórki pęcherzykowe; TZP (ang. *trans zonal projection*) – wypustki komórek pęcherzykowych; GJ (ang. *gap junctions*) – połączenie szczelinowe; GDF9 (ang. *growth differentiation factor 9*) – czynnik wzrostowy 9; TAG – triacyloglicerole; LD (ang. *lipid droplets*) – krople lipidowe; FCS (ang. *fetal calf serum*) – płodowa surowica cielęca; NEFA (ang. *non-esterified fatty acids*) – niezestryfikowane kwasy tłuszczowe; FA (ang. *fatty acids*) – kwasy tłuszczowe

Finansowanie: Działalność Badawcza UPP – 506.534.04.00

STRESZCZENIE

Potencjał rozwojowy oocytów i zarodków jest jednym z kluczowych czynników wpływających na sukces w rozrodzie. Ponieważ zarodki pozyskane *in vitro* posiadają obniżoną jakość, opracowanie nieinwazyjnego systemu ich oceny jest priorytetem. Jednym z podstawowych parametrów kształtujących potencjał rozwojowy gamet/zarodków i wpływających na mechanizmy rozrodcze jest metabolizm lipidów. Oocyty i zarodki ssaków gromadzą lipidy w kroplach lipidowych, których liczba i wielkość jest gatunkowo specyficzna. Wzrostowi i dojrzewaniu oocytu, a także rozwojowi zarodka, towarzyszy duża dynamika ilościowych i jakościowych przemian lipidów, która wpływa na ich jakość oraz przydatność do mrożenia. Istnieje możliwość modyfikacji parametrów lipidów zarówno *in vivo* jak i *in vitro* poprzez dodatek tłuszczu do diety oraz pożywek hodowlanych. Niniejsze opracowanie przedstawia aktualny stan wiedzy na temat zaangażowania lipidów w kształtowanie potencjału rozwojowego oocytów i zarodków ssaków głównie na przykładzie modeli dwóch gatunków zwierząt gospodarskich – bydła i świni domowej.

POTENCJAŁ ROZWOJOWY OOCYTÓW I ZARODKÓW – WPROWADZENIE

Efektywność rozrodu mierzona prawdopodobieństwem uzyskania potomstwa kształtowana jest przez wiele czynników związanych z samicą, oocytem i zarodkiem oraz środowiskiem. W warunkach naturalnych, *in vivo*, procesom rozrodczym towarzyszy zaskakująco duża skala degeneracji zarodków. Wykazano, że ok. 90% owulowanych oocytów młodych krów ulega zapłodnieniu, podczas gdy współczynnik urodzonych cieląt wynosi średnio 40–50% [1]. W przypadku zarodków pozyskanych w warunkach laboratoryjnych (*in vitro*) efektywność jest niższa, ale występuje podobny trend. Około 80% oocytów bydła ulega zapłodnieniu, 30–40% z nich uzyskuje stadium blastocysty, 40% zarodków przeniesionych do samicy przeżywa do 40 dnia ciąży, a 30% do porodu [2]. Ze względu na złożoność zjawiska, identyfikacja czynników wpływających na zamieralność zarodków jest bardzo utrudniona.

Jednym z czynników mających istotny wpływ na skuteczność rozrodu jest potencjał rozwojowy oocytów/zarodków (ang. *developmental potential, developmental competence, viability*). Warto zaznaczyć, że obok pojęcia „potencjał rozwojowy” w użyciu znajduje się jeszcze pojęcie „jakość” (ang. *quality*). Pomimo tego, że pojęcia te używane są naprzemiennie, ich istota w znaczeniu aplikacyjnym się nieco różni. Jakość jest pojęciem bardziej „statycznym”, gdyż nawiązuje do zespołu cech ocenianych na danym etapie rozwoju oocytu/zarodka i ich potencjalnego wpływu na dalszy rozwój zarodka i płodu, które zwykle nie są znane. Natomiast potencjał rozwojowy jest pojęciem szerszym i „dynamicznym”, gdyż obejmuje analizę wybranych właściwości oocytu/zarodka w powiązaniu z dalszym rozwojem. Kompleksowy system oceny kompetencji rozwojowej oocytów i zarodków bydła przedstawili Sirard i wsp. [3] proponując 5-stopniową skalę obejmującą następujące zdolności: 1) do wznowienia mejozy, 2) do uruchomienia podziałów po zapłodnieniu, 3) do uzyskania stadium blastocysty, 4) do implantacji oraz 5) do pełnego rozwoju zdrowego płodu. Przyjmując tę skalę, można stwierdzić, że ocena oocytów/zarodków pozyskiwanych *in vitro* do celów eksperymentalnych obejmuje zwykle stopnie 1–3. Pełną skalę oceny kompetencji można natomiast zastosować w odniesieniu do zarodków pozyskanych *in vitro* z oocytów pochodzących od krów o wysokiej wartości genetycznej i przeznaczonych do celów hodowlanych.

Pierwsze publikacje na temat potencjału rozwojowego skupiały się na porównaniu zarodków pozyskanych *in vivo* oraz *in vitro*. Punktem odniesienia w badaniach porównawczych jest tzw. „złoty standard” (ang. *gold standard*), który odpowiada zarodkowi o wysokim potencjale rozwojowym rozwijającemu się *in vivo* [4]. Holm i Callesen [5] stwierdzili, że wprawdzie zarodki obu kategorii są podobne pod względem szeregu parametrów, jednak istotnie różnią się w

zakresie niektórych ścieżek metabolicznych oraz poziomu mRNA genów istotnych dla przedimplantacyjnego rozwoju. Cechami różnicującymi zarodki pozyskane *in vivo* i *in vitro* są także parametry morfologiczne, kinetyka rozwoju oraz przeżywalność mrożenia. Szczególną uwagę zwrócono na parametry charakteryzujące efektywność rozrodu, czyli odsetek ciąż w odniesieniu do liczby przeniesionych zarodków i prawidłowość rozwoju płodu. W odniesieniu do zarodków pozyskanych *in vitro* podkreślono obniżoną żywotność szczególnie po przeniesieniu mrożonych zarodków oraz ryzyko pojawiania się tzw. dużych płodów (ang. *large offspring syndrome*, LOS). Wykazano, że prawdopodobieństwo osiągnięcia stadium blastocysty zależy głównie od jakości oocyty, podczas gdy jakość uzyskiwanych blastocyst kształtowana jest przede wszystkim przez środowisko rozwoju zarodków [6]. Można zatem stwierdzić, że uzyskanie wyższego odsetka blastocyst w warunkach *in vitro* może być osiągnięte głównie poprzez polepszenie jakości oocytów.

Ze względu na kompleksowość zagadnienia, ocena potencjału rozwojowego/jakości oocytów i zarodków obejmuje szereg parametrów związanych zarówno z oocytem/zarodkiem (cechy wewnętrzne = ang. *intrinsic*) jak i ze środowiskiem rozwoju (cechy zewnętrzne = ang. *extrinsic*). Podstawowy zestaw cech wewnętrznych oocytów uwzględniany w ocenie jakości obejmuje: morfologię, dojrzałość mejoetyczną i zestaw chromosomów, dystrybucję organelli np. ziaren korowych, występowanie apoptozy, profil transkryptów oraz wybrane parametry kropli lipidowych. W odniesieniu do cech zewnętrznych wyróżnia się czynniki związane z dawczynią np. wiek, żywienie oraz z warunkami dojrzewania (*in vivo* vs *in vitro*). Zestaw parametrów najczęściej analizowany w przypadku przedimplantacyjnych zarodków obejmuje morfologię, kinetykę rozwoju, zestaw chromosomów, indeks apoptotyczny oraz profile transkryptów i metabolitów (cechy wewnętrzne), oraz warunki rozwoju (np. skład pożywki do hodowli *in vitro*). Oceniane parametry dzielą się na nieinwazyjne, gdy ich analiza nie wymaga ingerencji w strukturę oocyty/zarodka (np. morfologia) oraz inwazyjne, wymagające takiej ingerencji (np. biopsja blastomeru) lub nawet zniszczenia badanej struktury (np. izolacja mRNA). Morfologia należy do najstarszych parametrów oceny jakości oocytów/zarodków i pomimo swych ograniczeń np. subiektywność, nadal jest elementem standardowej procedury. Stwierdzono związek jakości z wybranymi cechami morfologii zarodków takimi jak kolor blastomerów, stopień kompaktacji moruli, kinetyka rozwoju, czas pierwszego podziału zygoty, czas osiągnięcia stadium blastocysty, stopień ekspansji i średnica blastocysty [2]. Wiadomo jednak, że brak zmian morfologicznych nie jest równoważny z wysoką kompetencją rozwojową, a zarodki o podobnej morfologii mogą różnić się istotnie pod względem liczby blastomerów czy indeksu apoptotycznego [4]. Ponieważ nieliczne z wymienionych parametrów mają charakter nieinwazyjny, uwaga naukowców skupia się na wybranych elementach środowiska rozwoju oocyty/zarodka jako potencjalnych źródłach danych. Należą do nich płyn i komórki pęcherzykowe, płyn jamy blastocysty oraz podłoża hodowlane po inkubacji zarodków. Analiza tych czynników jest obecnie wiodącym nurtem badań zmierzających do identyfikacji nieinwazyjnych markerów jakości

oocytów/zarodków przy użyciu szeregu technologicznie zaawansowanych procedur nowej generacji określanymi jako wysokoprzepustowe (ang. *high-throughput techniques* [7]). Dynamiczny rozwój tych procedur i ich wykorzystanie w badaniach oocytów i zarodków są przede wszystkim napędzane potrzebą podnoszenia efektywności procedury wspomaganego rozrodu człowieka. Należy jednak podkreślić, że modele zwierzęce stanowią tutaj niezbędne ogniwo będące źródłem cennych informacji wyjaśniających badane mechanizmy rozrodcze. Wysokoprzepustowe techniki funkcjonują w grupach określanymi mianem „omics”. Do podstawowych należą genomika, transkryptomika, proteomika i metabolomika, przy czym obszar „omics” dynamicznie się rozwija włączając takie kategorie jak sekretomika (ang. *secretomics*) czy lipidomika (ang. *lipidomics*). Cechą wspólną wysokoprzepustowych procedur jest generowanie olbrzymiej liczby danych wymagających gruntownej, bioinformatycznej analizy. Dostępna literatura prezentująca wyniki badań oocytów/zarodków z użyciem wysokoprzepustowych technik jest imponująca. Należy jednak podkreślić, że mimo lawinowo rosnącej bazy biologicznych danych i wielu parametrów kandydujących do miana potencjalnego biomarkera, nadal nie zidentyfikowano biomarkera potencjału rozwojowego zarodków [7]. Sugeruje się, że na wspomniane trudności składa się wiele czynników m.in. różne układy doświadczalne, zmienność badanego materiału biologicznego oraz zróżnicowane procedury diagnostyczne. Szczególny nacisk kładzie się na konieczność wykorzystania tzw. modelu *multi-omics* czyli kompleksowej analizy prób biologicznych np. transkryptomu i epigenomu. Ponadto uzyskanie wyników przydatnych w praktyce klinicznej czy hodowlanej wymaga zgromadzenia pełnych informacji na temat rozwoju zarodkowego. Tutaj klasycznym podejściem jest analiza retrospektywna danych zgromadzonych przed przeniesieniem zarodka do macicy z uwzględnieniem późniejszej informacji o jego implantacji i rozwoju płodu. Okazuje się jednak, że pomimo identyfikacji potencjalnych biomarkerów, ich uniwersalność jest ograniczona, gdyż nie zawsze znajdują potwierdzenie w innych układach doświadczalnych.

Ze względu na kluczowe znaczenie lipidów w kształtowaniu jakości oocytów i zarodków oraz dynamiczny rozwój procedur diagnostycznych pozwalających na kompleksową analizę procesów metabolicznych, lipidy zyskały bardzo duże zainteresowanie także w kontekście identyfikacji biomarkerów. Celem niniejszego opracowanie jest przedstawienie aktualnego stanu wiedzy na temat zaangażowania lipidów w kształtowanie potencjału rozwojowego oocytów i zarodków ssaków głównie na przykładzie modeli dwóch gatunków zwierząt gospodarskich – bydła i świni domowej.

BIOCHEMICZNE PODSTAWY METABOLIZMU LIPIDÓW

Znaczenie lipidów dla biologii komórki jest bardzo szerokie. Lipidy są przede wszystkim materiałem budulcowym błon komórkowych, biorą udział w modyfikacji białek i stanowią materiał energetyczny. Pełnią także funkcję hormonów i międzykomórkowych przekaźników. Zapotrzebowanie energetyczne organizmu ssaka pokrywane jest w 40–60% przez węglowodany, w 30–40% przez lipidy, a jedynie w 10–15% przez białka. Pomimo, iż podstawowym

źródłem energii dla większości tkanek jest glukoza, istotną częścią rezerwy energetycznej są triacyloglicerole – TAG, pozyskiwane na drodze estyfikacji kwasów tłuszczowych z glicerolem. Wysoka wartość energetyczna TAG wynika z faktu, iż są to związki zredukowane, co pozwala na uzyskanie ok. 37,7kJ energii z 1g kwasu tłuszczowego (dla porównania – 1g cukru to jedynie 16,7kJ energii). W celu pozyskania ATP, TAG na drodze lipolizy przekształcane są do wolnych kwasów tłuszczowych, które następnie na drodze β -oksydacji przekształcane są w acetylo-CoA. Związek ten może być podstawą trzech procesów: wchodzić do cyklu kwasu cytrynowego i fosforylacji oksydacyjnej, być prekursorem cholesterolu i innych sterydów lub może tworzyć ciała ketonowe [8].

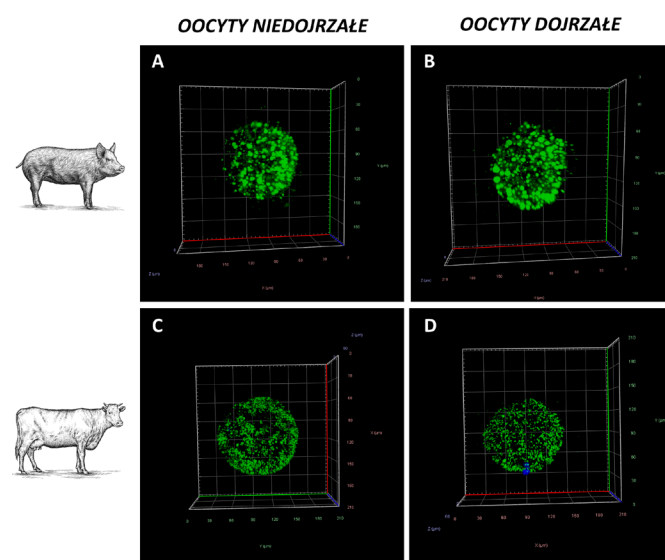
Komórki gromadzą lipidy w formie TAG w wyspecjalizowanych organellach zwanych kroplami lipidowymi (LD). Mimo, że krople lipidowe magazynują obojętne lipidy obecne we wszystkich komórkach, ich morfologia i skład różnią się nawet w obrębie tej samej populacji komórek. LD są otoczone monowarstwą fosfolipidową zamykającą wewnętrzny rdzeń wypełniony TAG i estrami steroli. Na powierzchni LD znajdują się białka, perilipiny, które stabilizują ich strukturę, a także stanowią barierę dla enzymów hydrolytycznych [9]. W biogenezę LD zaangażowana jest siateczka śródplazmatyczna, ale krople lipidowe nawiązują również kontakt z peroksyosomami, mitochondriami czy lizosomami, co wskazuje na ich udział w wielu procesach komórkowych i różnicowanej funkcji [10]. Ostatnie odkrycia wskazują także na obecność LD na wewnętrznej błonie jądrowej i w jądrze komórkowym, choć ich funkcje i mechanizm powstawania wymagają wyjaśnienia [11].

METABOLIZM LIPIDÓW W PROCESIE WZROSTU I DOJRZEWANIA KOMPLEKSÓW WZGÓREK JAJONOŚNY-OOCYT

W czasie wzrostu i dojrzewania oocytom towarzyszą somatyczne komórki pęcherzykowe tworząc mutualny związek, kompleks wzgórek jajonośny-oocyt, określany również jako kompleks oocyt-cumulus (COC). Z jednej strony, komórki cumulus są pośrednikiem pomiędzy oocytem, a środowiskiem pęcherzykowym (lub środowiskiem wzrostu, jeśli COC podlega inkubacji w warunkach *in vitro*), a więc pełnią rolę informatora, czynnie uczestnicząc w regulacji metabolizmu oocyta. Z drugiej strony, wymiana informacji jest dwukierunkowa, zatem oocyt poprzez oddziaływanie parakryne wpływa na otaczające go komórki cumulus. Wymiana informacji odbywa się przy udziale trzech mechanizmów: 1) pomiędzy komórkami pęcherzykowymi i oocytem poprzez wypustki (TZP), 2) pomiędzy komórkami pęcherzykowymi za pośrednictwem złączy szczelinowych (GJ) i 3) na zakończeniach wypustek TZP, na których obecne są także połączenia adhezyjne [12]. Udowodniono, że wydzielany przez oocyty czynnik GDF9 jest odpowiedzialny za wykształcenie TZP, a zatem pełni główną rolę niezbędną do prawidłowego rozwoju COC. Wraz ze wzrostem oocyta liczba TZP zwiększa się dzięki czemu możliwa jest dynamiczna interakcja i zapewnienie dostaw niezbędnych substratów. Istotną rolę złączy szczelinowych wykazano głównie z użyciem techniki knock-out, doprowadzając do wyłączenia ekspresji genów kodujących białka zaangażowane w budowę połą-

czeń międzykomórkowych lub poprzez hodowlę oocytów pozbawionych komórek pęcherzykowych. Z kolei analiza przy pomocy mikroskopii elektronowej wykazała różnice w poziomie wewnątrzkomórkowych lipidów pomiędzy oocytami otoczonymi przez cumulus i ich pozbawionych. GDF9 i BMP15, dwa najlepiej poznane czynniki wydzielane przez oocyt, czynnie uczestniczą w gospodarce energetycznej, w którą istotnie zaangażowane są także komórki cumulus. Stąd wiadomo, że dwukierunkowa, efektywna współpraca oocyta i komórek cumulus jest nadrzędna dla wykształcenia COC o wysokim potencjale rozwojowym. Wiadomo jednak, że oocyty, które dojrzewają w warunkach *in vitro* wykazują zmieniony metabolizm i gromadzą większe ilości lipidów w porównaniu do oocytów owulowanych. Dlatego środowisko wzrostu i dojrzewania oocytów ma kluczowe znaczenie dla homeostazy COC. Dotyczy to także warunków *in vivo*, szczególnie w stanach patologicznych, gdzie zmieniony poziom i profil kwasów tłuszczowych w płynie pęcherzykowym może prowadzić do gromadzenia większej ilości lipidów.

Procesowi folikulogenezy towarzyszą zmiany zarówno na poziomie jądrowym, jak i cytoplazmatycznym oocytów, dzięki czemu nabywają one kompetencji rozwojowej niezbędnej do prawidłowego zapłodnienia i rozwoju przedimplantacyjnego zarodka. Od wielu lat główny nurt badań jest skoncentrowany na dojrzewaniu cytoplazmy oocytów, co w dużym uproszczeniu oznacza procesy związane z gromadzeniem substancji zapasowych i reorganizacją organelli komórkowych. Oba wymienione zjawiska dotyczą także lipidów oraz kropli lipidowych. Wykazano, że oocyty różnych gatunków zwierząt różnią się znacznie zawartością kropli lipidowych (Ryc. 1). Przyczyny tego zróżnicowania nadal pozostają niewyjaśnione i trudno o prostą odpowiedź na pytanie, w jakim celu oocyt gromadzi bardzo duże ilości tłuszczu. Dla przykładu, oocyty świni domowej czy psa zawierają średnio 3 krotnie więcej lipidów (156 ng) niż oocyty



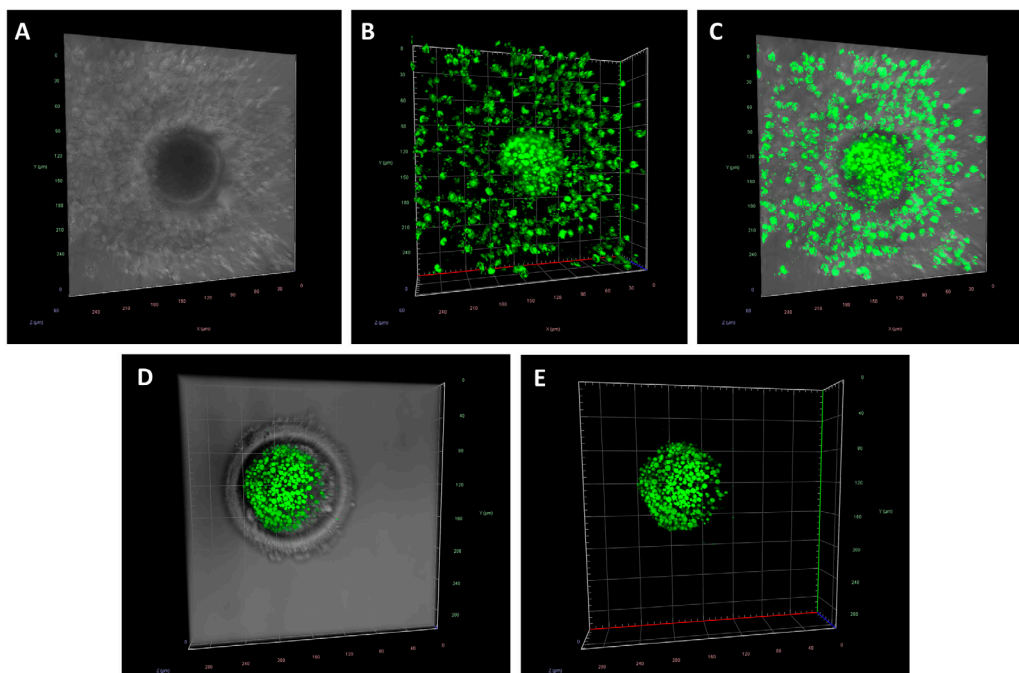
Rycina 1. Projekcje 3D wybarwionych w kierunku wizualizacji kropli lipidowych oocytów świni (A, B) i bydła (C, D) pozyskanych z pęcherzyka jajnikowego (A, C) oraz po dojrzewaniu *in vitro* (B, D). Zdjęcia uzyskane przy użyciu mikroskopii konfokalnej (obrazowanie z-stack) i oprogramowania ZEN (Zeiss). Sygnał zielony – krople lipidowe (barwnik BODIPY 493/503), sygnał niebieski – chromatyna (DAPI).

przeżywalności np. bydła i owiec (odpowiednio 58 ng i 4 ng), a obserwacja struktur w obrębie cytoplazmy przy użyciu mikroskopu świetlnego jest znacznie utrudniona przez brak przezroczystości spowodowany nagromadzeniem lipidów [13]. Zdecydowanie mniej lipidów zawierają oocyty myszy, szczura i człowieka. Oocyty różnych gatunków ssaków różnią się nie tylko pod względem ilości lipidów, ale także morfologii LD. Oocyty jednego gatunku wykazują względnie stałą populację LD o zbliżonej wielkości (około 1–2 μm), podczas gdy oocyty innych gatunków np. borsuka, świni domowej, charakteryzuje duża zmienność średnicy LD od niewielkich do dużych o średnicy około 10 μm [14]. W oocytach zwierząt gospodarskich o średnicy od 100 do 150 μm zawierających kilkaset kropli lipidowych, mogą one zajmować od kilku do nawet kilkunastu procent powierzchni komórki [15]. Nadal nie określono ilości lipidów wewnątrzkomórkowych odpowiadającej wysokiemu potencjałowi rozwojowemu oocyty. Wiadomo jednak, że w porównaniu z oocytami dojrzewającymi *in vivo*, ilość lipidów gromadzona w oocytach inkubowanych *in vitro* jest znacznie wyższa. Pod względem funkcjonalnym, wysoka zawartość lipidów znacząco utrudnia kriokonserwację gamet oraz obniża ich przeżywalność po rozmrożeniu. Próżno jednak szukać definicji stanu patologicznego odpowiadającego warunkom lipotoksyczności, które istotnie ograniczają szanse na uzyskanie prawidłowego zarodka. W tym przypadku, "więcej nie musi oznaczać lepiej", a ponadto większość badań sugeruje ilość teoretycznie optymalną (podobnie jak w przypadku poziomu ATP), która zapewni prawidłowe funkcjonowanie komórki.

Nieprzypadkowo fragment poświęcony regulacji metabolizmu lipidów w COC rozpoczęto od istotnej funkcji komórek *cumulus* oraz połączeń typu TZP i GJ. W ostatnich latach udowodniono, że komórki te w przypadku wysokiej

podażą kwasów tłuszczowych w środowisku akumulują znaczne ilości lipidów (Ryc. 2), chroniąc oocyt przed lipotoksycznością. Wykazano, że komórki *cumulus* pobierają ze środowiska kwasy tłuszczowe przy udziale translokazy CD36 i przekazują je do oocyty przy pomocy białek wiążących FA, w tym przypadku FABP3, które to białko zlokalizowano w TZP dojrzewających oocytów bydła. Pośrednio wykazano, że wzmożone odkładanie lipidów w dojrzewających *in vitro* oocytach może wynikać z wysokiej ekspresji białek zaangażowanych w transport FA [16]. Jednak sam transport do oocyty, który może być selektywny ze względu na rodzaj FA, nie został do końca poznany. Wiadomo jednak, że nasycone i nienasycone kwasy tłuszczowe mają odmienny wpływ na metabolizm i potencjał rozwojowy COC. Ciekawym, choć jeszcze nie do końca zbadanym obszarem jest kinetyka oddziaływania środowiska wzrostu na dojrzewający COC. W trakcie dojrzewania, komórki *cumulus* ulegają mucyfikacji, zanikaniu połączeń szczelinowych i w ślad za tym prawdopodobnie ograniczaniu zdolności do komunikacji i wymiany substratów. W związku z tym należałoby przyjąć, że krytyczne dla gospodarki lipidowej będą pierwsze godziny dojrzewania COC, ale efekt tego działania może mieć konsekwencje długofalowe.

Wzrost i dojrzewanie COC mają miejsce w pęcherzyku jajnikowym, a bezpośrednim środowiskiem dla tych procesów jest płyn pęcherzykowy, na którego skład wpływa wiele czynników. Wykazano, iż istnieje związek pomiędzy profilem lipidowym surowicy krwi, a profilem lipidowym płynu pęcherzykowego, aczkolwiek obserwowane parametry nie są tożsame (prawdopodobnie dochodzi do selektywnego przekazywania wybranych związków). Niemniej profil lipidowy płynu pęcherzykowego jest parametrem istotnym dla jakości rozwijającego się COC, co niejednokrotnie wykazywano w doświadczeniach *in vivo* (analiza składu płynu



Rycina 2. Projekcje 3D wybarwionych w kierunku wizualizacji kropli lipidowych: (A-C) kompleksów wzgórek jajonośny-oocyt świni i (D,E) oocytów świni pozbawionych komórek pęcherzykowych. Zdjęcia uzyskane przy użyciu mikroskopii konfokalnej (obrazowanie z-stack) i oprogramowania ZEN (Zeiss). Widoczne silne sygnały pochodzące z komórek *cumulus* otaczających oocyt (B) oraz liczne krople lipidowe w oocycie po dojrzewaniu (stadium MII). Sygnał zielony – krople lipidowe (barwnik BODIPY 493/503).

pęcherzykowego), jak i podczas dojrzewania *in vitro* (stosowanie pożywek suplementowanych wybranymi kwasami tłuszczowymi) [17]. W wielu badaniach prowadzonych na oocytach bydła wykazano, że podwyższona koncentracja nasyconych kwasów tłuszczowych podczas IVM skutkowała obniżeniem % blastocyst, zaburzeniem ekspansji komórek *cumulus* oraz ich częstszą apoptozą. Podobne wyniki uzyskano dla COC owiec, gdzie testowano głównie nasycone kwasy tłuszczowe: stearynowy i palmitynowy. Nasycone kwasy tłuszczowe powodowały także zmiany w profilu ekspresji genów zaangażowanych w ścieżki sygnalizacyjne śmierci komórkowej czy stresu oksydacyjnego. Wysokie stężenia kwasów tłuszczowych najczęściej prowadzą do tzw. stresu siateczki śródplazmatycznej, a więc akumulacji nieprawidłowo sfałdowanych białek, zahamowania translacji i uruchomienia mechanizmów śmierci komórkowej. Odwrotną, zwykle stymulującą rolę pełnią nienasycone kwasy tłuszczowe, które jak np. kwas oleinowy, mogą neutralizować negatywne działania kwasów nasyconych [18]. Tym samym efekt oddziaływania nienasyconych kwasów tłuszczowych będzie zależał w dużej mierze od ich wzajemnych proporcji ilościowych i jakościowych w płynie pęcherzykowym lub pożywce hodowlanej. Warto zaznaczyć, że nie wszystkie systemy dojrzewania oocytów *in vitro* wykorzystują w pełni zdefiniowane pożywki. W przypadku oocytów świni, pożywkę IVM rutynowo uzupełnia się 10-20% objętością płynu pęcherzykowego. Ze względu na brak informacji na temat składu płynu pęcherzykowego, który zależy od wielu czynników np. od wieku samicy czy wielkości pęcherzyków jajnikowych, pożywka do dojrzewania staje się niezdefiniowana. W tym układzie utrudniona jest również analiza wpływu wybranego czynnika na metabolizm COC, co kontrastuje z innymi gatunkami np. bydłem, gdzie można stosować suplementację wybranymi FA i oceniać ich wpływ na różnych poziomach odpowiedzi komórkowej. Uważa się, że trzy spośród nienasyconych kwasów tłuszczowych – oleinowy, linolowy (obecne w wysokich stężeniach w płynach pęcherzykowych) i arachidonowy wywierają jednoznacznie neutralny lub pozytywny wpływ na komórki pęcherzykowe i oocyty podczas IVM, a także powodują podniesienie efektywności hodowli zarodków i ich jakości. Wysokie stężenie kwasów tłuszczowych prowadzi do akumulacji lipidów w komórkach *cumulus*, jednak reakcja komórki zależy od rodzaju FA. Stwierdzono odmienną odpowiedź komórek pęcherzykowych świni na wysokie stężenia kwasów stearynowego (nasycony FA) i oleinowego (nienasycony FA) w postaci odpowiednio 1) tworzenia mikro kropli lipidowych i lipolizy oraz 2) masowego odkładania lipidów i powiększania powierzchni LD [19]. Wraz ze zmianą metabolizmu lipidów, w komórkach pęcherzykowych obserwuje się istotny wzrost ekspresji genów zaangażowanych w gospodarkę lipidową. Uważa się, że komórki *cumulus* chronią niejako oocyt przed zbyt wysoką podażą kwasów tłuszczowych w środowisku jednocześnie umożliwiając selektywny ich transfer [20,21]. Analizowano wpływ kilku kwasów tłuszczowych na jakość COC i zarodków bydła, owiec i świni. W większości przypadków dotyczyło to kwasów nasyconych, stearynowego i palmitynowego oraz nienasyconych, oleinowego i linolowego, które dominują w płynach pęcherzykowych tych gatunków. Kwas linolowy jest niezbędnym FA występującym w naj-

wyższej koncentracji w płynie pęcherzykowym bydła. Jest prekursorem kwasu arachidonowego, który z kolei dalej wykorzystywany jest do syntezy prostaglandyn, związków istotnych w procesach rozrodu. Sam kwas arachidonowy, obecny w warstwie fosfolipidowej błony komórkowej jest zaangażowany w komunikację międzykomórkową i stanowi istotny czynnik kształtujący jakość oocytów. Wykazano, że suplementacja kwasu linolowego może poprawiać przeżywalność zarodków po mrożeniu, (pomimo zwiększenia ilości wewnątrzkomórkowych lipidów), przy czym zbyt wysokie stężenie może prowadzić do inhibicji dojrzewania jądrowego [22]. Pomijając badania indywidualnych FA, olbrzymią część eksperymentów na oocytach bydła poświęcono mieszaninie różnych proporcji i stężeń trzech kwasów tłuszczowych (ang. *non-esterified fatty acids*, NEFA – kwas stearynowy, palmitynowy, oleinowy). Warto zaznaczyć, że dojrzewanie oocytów bydła w pożywce z podwyższonym stężeniem NEFA może stanowić model badawczy dla chorób metabolicznych lub negatywnego bilansu energetycznego u krów mlecznych. Wyższa ilość NEFA powodowała modyfikację profilu ekspresji genów zaangażowanych w transkrypcję, apoptozę czy implantację zarodka, a także poziomu metylacji genów podlegających piętnowaniu [23]. Co ciekawe, w przypadku świni, dodatek NEFA do pożywek IVM spowodował tylko częściowy, pozytywny wpływ na COC w porównaniu do suplementacji płynem pęcherzykowym. Świadczy to o złożonym składzie płynu pęcherzykowego i znaczeniu zawartych w nim substancji czynnych dla dojrzewania oocytów tego gatunku [24]. Wiadomo jednak, że NEFA stanowią główny substrat do produkcji ATP podczas wzrostu i dojrzewania oocytu, a także później w rozwoju zarodkowym.

Wreszcie warto zwrócić uwagę na bilans energetyczny wynikający z utleniania pojedynczego kwasu tłuszczowego, które może prowadzić do powstania 106 cząsteczek ATP. Dla porównania, z pojedynczej cząsteczki glukozy komórka może wytworzyć 30 cząsteczek ATP. Glukoza może być pobierana przez oocyt ze środowiska lub przez komórki wzgórką jajonośnego i metabolizowana w procesie glikolizy, cyklu kwasu cytrynowego lub w szlaku pentozofosforanowym. Biorąc jednak pod uwagę istotną korzyść wynikającą z procesu beta-oksydacji kwasów tłuszczowych można stwierdzić, że NEFA mogą stanowić główny substrat do produkcji ATP podczas wzrostu i dojrzewania oocytu, a także później w rozwoju zarodkowym [25].

METABOLIZM LIPIDÓW W ZARODKACH

Zarodki ssaków mogą czerpać energię z różnych źródeł (glukoza, kwasy tłuszczowe, aminokwasy), przy czym glukoza jest dominującym substratem w metabolizmie energetycznym. Zarodki we wczesnych stadiach rozwojowych korzystają głównie z produktów przemiany glukozy tj. pirogronianu i mleczanu, pozyskując je ze środowiska zewnętrznego (*in vivo* będzie to płyn jajowodowy, a *in vitro* – pożywka). Wprawdzie posiadają transportery Glut umożliwiające pobieranie glukozy, jednakże do momentu aktywacji genomu zarodka (u bydła jest to stadium 8-16 blastomerów) aktywność owych transporterów jest bardzo niska. Ponadto wczesne zarodki wykorzystują również zapasy energetyczne zebrane podczas wzrostu i dojrzewania

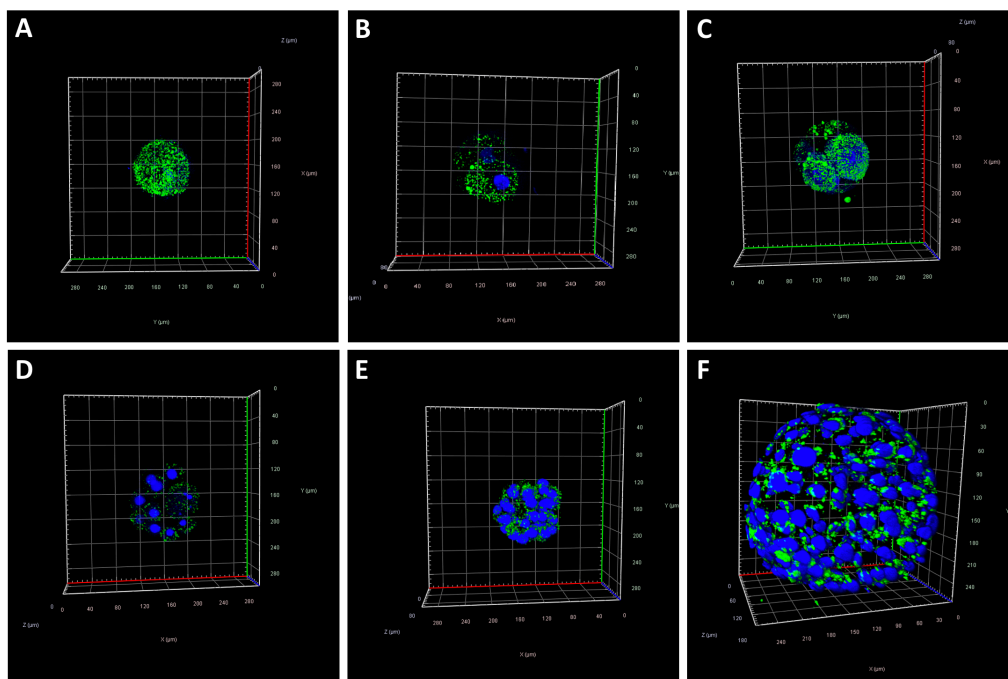
oocytów (zagadnienie omówione we wcześniejszym rozdziale), co jak wiadomo różni się pomiędzy gatunkami. Moment aktywacji genomu zarodka jest również gatunkowo specyficzny, zatem przejście metabolizmu energetycznego w głównym stopniu na glukozę będzie istotnie zależne od gatunku. Badania potwierdzają, iż stadium blastocysty jest momentem, w którym aktywność genów zaangażowanych w metabolizm glukozy osiąga najwyższy poziom [26]. Niemniej jednak lipidy stanowią również istotny element kształtowania kompetencji rozwojowej zarodków, a szereg doświadczeń wskazuje na istotny związek pomiędzy zaburzeniami metabolizmu lipidów a prawidłowym rozwojem zarodkowym [27].

Przedimplantacyjne zarodki charakteryzują się dużym dynamizmem przemian metabolicznych, także w zakresie ilościowych i jakościowych cech lipidów (Ryc. 3). Wykazano między innymi, iż poziom lipidów magazynowanych w LD jest stabilny we wczesnych zarodkach bydła, istotnie wzrasta w stadium moruli, po czym ulega istotnej redukcji w stadium blastocysty [28]. Spadek zawartości lipidów w stadium blastocysty wiąże się ze zwiększonym zapotrzebowaniem zarodka, szczególnie komórek trofoblastu, na energię wydatkowaną głównie na ekspansję jamy blastocysty i proces wylęgania [29]. Ponadto, intensywne proliferacja komórek blastocysty wynika ze zwiększonego zapotrzebowania na fosfolipidy, będące kluczowym budulcem powstających błon komórkowych [28].

Rozwój przedimplantacyjnego zarodka wiąże się nie tylko ze zmianami ilości lipidów, ale także ich profilu, który zależy od stadium rozwojowego oraz jakości. Frakcją dominującą w blastomerach zarodków bydła są fosfolipidy. Najbardziej dynamiczne zmiany podczas rozwoju zarodkowego zaobserwowano w grupie związków nazywanych fos-

fatydylocholinami, które wraz ze sfingomielinami stanowią główny element budulcowy błon komórkowych. Ilość tych lipidów ma wpływ na właściwości błon biologicznych m.in. płynność i przepuszczalność, co warunkuje żywotność komórek, skuteczność zamrażania/rozmarzania i ostateczny sukces w rozrodzie [30].

Badania pokazują, iż ilość lipidów ma istotny związek z jakością zarodków. Zarodki bydła hodowane w warunkach *in vitro* zawierają istotnie więcej lipidów niż zarodki pozyskane *in vivo* [31]. Różnice te dotyczą także profilu lipidowego [32,33]. Może to mieć związek z warunkami fizyko-chemicznymi (m.in. skład pożywek), gdyż np. pożywki uzupełniane płodową surowicą cielęcą (FCS) wpływają na zwiększony pobór i akumulację lipidów w zarodkach bydła w stadium moruli i blastocysty [28]. Sugeruje się również, iż wzrost poziomu lipidów w zarodkach pozyskanych *in vitro* może być pośrednim efektem ich reakcji na stres oksydacyjny [27]. Wpływ zawartości lipidów na jakość zarodków ma kluczowe znaczenie w kontekście kriokonserwacji. Okazuje się bowiem, że dla prawidłowego przechowywania zarodków w niskich temperaturach konieczny jest optymalny poziom wewnątrzkomórkowych lipidów. Oznacza to, iż wysoka koncentracja lipidów zaburza procesy zamrażania i rozmrażania. Przyczyną obniżonej żywotności mrożonych zarodków są zmiany struktury i integralności wewnątrzkomórkowych lipidów. Kriokonserwacja może prowadzić także do naruszenia integralności podwójnej warstwy fosfolipidów w błonach komórkowych, co w konsekwencji obniża zdolność re-ekspansji blastocyst, zmniejsza liczbę blastomerów oraz indukuje apoptozę [33]. Biorąc pod uwagę szerokie zastosowanie kriokonserwacji zarodków we wspomaganym rozrodzie człowieka i zwierząt, jest to zjawisko niezwykle istotne dla praktyki laboratoryjnej. Zwiększenie skuteczności mrożenia można uzyskać w dwojaki sposób –



Rycina 3. Projekcje 3D wybarwionych w kierunku wizualizacji kropli lipidowych i chromatyny zarodków bydła hodowanych w warunkach *in vitro*. Zdjęcia uzyskane przy użyciu mikroskopii konfokalnej (obrazowanie z-stack) i oprogramowania ZEN (Zeiss). Widoczne kolejne stadia rozwojowego zarodka A) zygota; B) 2-blastomerowe; C) 4-blastomerowe; D) 8-16-blastomerowe; E) morula; F) blastocysta. Sygnał zielony – krople lipidowe (barwnik BODIPY 493/503), sygnał niebieski – chromatyne (DAPI).

poprzez optymalizację metodyki zamrażania (głównie stosowanie optymalnych zakresów temperatur oraz środków osłaniających), albo poprzez zmianę składu cytoplazmy blastomerów. Laboratoryjna modyfikacja profilu lipidowego zarodków może zmienić płynność błon komórkowych, a w konsekwencji właściwości fizyko-chemiczne blastomerów. Sugerowanym sposobem modyfikacji profilu lipidowego zarodków jest zmiana składu pożywki hodowlanej. Wykazano bowiem, iż stosowanie pożywki bez surowicy, która jak wiadomo zwiększa ilość lipidów w zarodkach, istotnie polepszyło przeżywalność mrożonych zarodków bydła [34]. Warto wspomnieć, że wiele lat temu wykazano korzystny wpływ usunięcia kropli lipidowych z zygot świni wyjątkowo bogatych w lipidy, na kompetencję rozwojową uzyskiwanych zarodków [35].

Należy podkreślić, iż profil lipidowy zarodków jest gatunkowo specyficzny [36]. Gatunkiem o szczególnie wysokiej zawartości lipidów jest świnia domowa (*Sus scrofa domestica*) [37]. Wykazano między innymi, iż partenogenetyczne blastocysty świni domowej mają istotnie więcej kropli lipidowych zarówno w całym zarodku jak i w pojedynczych blastomerach w porównaniu z zarodkami bydła pozyskanymi *in vitro* [38]. Jak dotąd nie wyjaśniono przyczyn tej międzygatunkowej zmienności. Niektórzy naukowcy uważają, iż większe zapasy energetyczne występują u gatunków charakteryzujących się późniejszą implantacją (np. zarodki psa domowego zawierające bardzo dużo lipidów – implantacja ok. 22 dnia po zapłodnieniu vs zarodki myszy ze skrajnie niską zawartością lipidów – implantacja ok. 4 dnia). Również bardziej liczne mioty mogą mieć związek z wyższym poziomem lipidów w zarodkach. Nie są to jednakże hipotezy poparte jednoznacznymi dowodami [39].

Jak wielokrotnie wskazywano, środowisko rozwoju zarodka ma kluczowe znaczenie dla jego metabolizmu energetycznego. Powstaje zatem pytanie, w jakim stopniu parametry związane z samicą (np. kondycja, stan metaboliczny) mają wpływ na omawiane elementy metabolizmu lipidowego w zarodku rozwijającym się *in vivo*. Wiadomo, że między zarodkiem, a organizmem matki istnieje skomplikowany system interakcji. Do zapłodnienia dochodzi w jajowodzie i jest to środowisko rozwoju wczesnego zarodka (np. u bydła do stadium moruli). Komórki wyścielające światło jajowodu wydzielają płyn, którego skład zależy od aktywności metabolicznej organizmu matki. Dalszy rozwój zarodka zachodzi w macicy, gdzie dochodzi do interakcji blastocysta-endometrium związanych z procesem implantacji. Jest to również moment, w którym czynniki pochodzenia matcznego w istotnym stopniu wpływają na zarodek, jego jakość i kompetencję. Opublikowano szereg prac dokumentujących znaczenie żywienia samicy (ze szczególnym naciskiem na suplementację diety wybranymi klasami lipidów) dla jakości rozwijającego się zarodka. W przypadku doświadczeń *in vivo* trudno oddzielić jednoznacznie wpływ stosowanego żywienia na jakość rozwijających się w jajnikach oocytów od wpływu na jakości rozwijających się w jajowodzie czy później w macicy zarodków. Wykazano jednakże, iż suplementacja diety np. nienasyconymi kwasami tłuszczowymi wpływa na skład lipidowy płynu jajowodu, co jak wiemy z doświadczeń *in vitro* może istotnie wpływać na zarodki. Pozytywny wpływ takiej suplementacji zaobserwowano

także przy ocenie odsetka uzyskiwanych dobrej jakości blastocyst. Ponadto uzupełnianie pożywek hodowlanych surowicą pozyskaną od samic żywionych dietą wzbogaconą o kwasy n-3 (wielonienasycone kwasy tłuszczowe) wpływało korzystnie na jakość uzyskiwanych zarodków [40,41]. Zatem metabolizm lipidowy w kontekście interakcji zarodek - matka wydaje się mieć również duże znaczenie.

Gromadzenie lipidów i ich znaczenie dla rozwijającego się zarodka zyskuje jeszcze inną perspektywę w odniesieniu do zjawiska diapauzy, występującej u niektórych gatunków dzikich zwierząt. Polega ona na zatrzymaniu rozwoju zarodka w stadium blastocysty i oczekiwaniu na bardziej sprzyjające warunki do implantacji. Celem diapauzy jest najczęściej dążenie w strategii reprodukcyjnej gatunku do narodzin potomstwa w jak najbardziej korzystnych warunkach środowiska. Dotychczas zjawisko to opisano u ponad 130 gatunków ssaków [42]. Wykazano, iż obecność kropli lipidowych w cytoplazmie jest kluczowa dla podtrzymania diapauzy, gdyż blastocysty w tym stanie wykorzystują głównie lipidy jako źródło energii. Ponadto, wraz z postępem diapauzy, ilość lipidów wewnątrzkomórkowych spada, a ich skład zmienia się [14]. Wyniki te potwierdzają kluczowe znaczenie zapasowych lipidów dla prawidłowego rozwoju przedimplantacyjnych zarodków i ich implantacji.

PODSUMOWANIE

Przedstawione informacje na temat roli lipidów w rozwoju oocytów i przedimplantacyjnych zarodków ssaków jednoznacznie potwierdzają kluczowe znaczenie tego parametru dla kształtowania ich potencjału rozwojowego. Należy także podkreślić istotność fizjologicznego poziomu lipidów dla procesów rozrodczych głównie w kontekście lipotoksyczności. Pomimo podstawowego znaczenia lipidów w tworzeniu błon komórkowych i syntetyzowaniu hormonów, ich zbyt wysoki poziom jest czynnikiem negatywnym, prawdopodobnie indukującym reakcje stresowe. Zarówno ilość jak i profil lipidów w oocyty/zarodku w znacznej mierze zależą od środowiska rozwoju. Dlatego niezmiernie istotnym elementem w warunkach *in vitro* jest optymalizacja składu pożywek hodowlanych natomiast w warunkach *in vivo* kompozycja diety samicy.

LITERATURA

1. Perkel KJ, Tscherner A, Merrill C, Lamarre J, Madan P (2015) The ART of selecting the best embryo: A review of early embryonic mortality and bovine embryo viability assessment methods. *Mol Reprod Dev* 82(11): 822-838
2. Rizo D, Clemente M, Bermejo-Alvarez P, de La Fuente J, Lonergan P, Gutiérrez-Adán A (2008) Consequences of *in vitro* culture conditions on embryo development and quality. *Reprod Domest Anim* 43 Suppl 4: 44-50
3. Sirard MA, Richard F, Blondin P, Robert C (2006) Contribution of the oocyte to embryo quality. *Theriogenology* 65(1): 126-136
4. Van Soom A, Mateusen B, Leroy J, De Kruif A (2003) Assessment of mammalian embryo quality: what can we learn from embryo morphology? *Reprod Biomed Online* 7(6): 664-670
5. Holm P, Callesen H (1998) *In vivo* versus *in vitro* produced bovine ova: similarities and differences relevant for practical application. *Reprod Nutr Dev* 38(6): 579-594
6. Rizo D, Ward F, Duffy P, Boland MP, Lonergan P (2002) Consequences of bovine oocyte maturation, fertilization or early embryo develop-

- ment *in vitro* versus *in vivo*: implications for blastocyst yield and blastocyst quality. *Mol Reprod Dev* 61(2): 234-248
7. Hernández-Vargas P, Muñoz M, Domínguez F (2020) Identifying biomarkers for predicting successful embryo implantation: applying single to multi-OMICs to improve reproductive outcomes. *Hum Reprod Update* 26(2): 264-3018
 8. Stryer L (1997) *Biochemia*. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa
 9. Itabe H, Yamaguchi T, Nimura S, Sasabe N (2017) Perilipins: a diversity of intracellular lipid droplet proteins. *Lipids Health Dis* 16(1): 83
 10. Henne WM, Reese ML, Goodman JM (2018) The assembly of lipid droplets and their roles in challenged cells. *EMBO J* 37(12): e98947
 11. Barbosa AD, Siniouoglou S (2020) New kid on the block: lipid droplets in the nucleus. *FEBS J* 287(22): 4838-4843
 12. Li R, Albertini DF (2013) The road to maturation: Somatic cell interaction and self-organization of the mammalian oocyte. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 14(3): 141-152
 13. McEvoy TG, Coull GD, Broadbent PJ, Hutchinson JS, Speake BK (2000) Fatty acid composition of lipids in immature cattle, pig and sheep oocytes with intact zona pellucida. *J Reprod Fertil* 118(1): 163-170
 14. Arena R, Bisogno S, Gašior Ł, Rudnicka J, Bernhardt L, Haaf T, Zucchini F, Bochenek M, Fic K, Bik E, Barańska M, Bodzoń-Kuśkowska A, Suder P, Depciuch J, Gurgul A, Polański Z, Ptak GE (2021) Lipid droplets in mammalian eggs are utilized during embryonic diapause. *Proc Natl Acad Sci U S A* 118(10): e2018362118
 15. Pawlak P, Warzych E, Cieslak A, Malyszka N, Maciejewska E, Madeja ZE, Lechniak D (2018) The consequences of porcine IVM medium supplementation with follicular fluid become reflected in embryo quality, yield and gene expression patterns. *Sci Rep* 8(1): 15306
 16. Del Collado M, da Silveira JC, Sangalli JR, Andrade GM, Sousa LRDS, Silva LA, Meirelles FV, Perecin F (2017) Fatty Acid Binding Protein 3 And Transzonal Projections Are Involved In Lipid Accumulation During *In Vitro* Maturation Of Bovine Oocytes. *Sci Rep* 7(1): 2645
 17. Aardema H, van Tol HTA, Vos PLAM (2019) An overview on how cumulus cells interact with the oocyte in a condition with elevated NEFA levels in dairy cows. *Anim Reprod Sci* 207: 131-137
 18. Aardema H, Vos PL, Lolicato F, Roelen BA, Knijn HM, Vaandrager AB, Helms JB, Gadella BM (2011) Oleic acid prevents detrimental effects of saturated fatty acids on bovine oocyte developmental competence. *Biol Reprod* 85(1): 62-69
 19. Pawlak P, Malyszka N, Szczeral I, Kolodziejski P (2020) Fatty acid induced lipolysis influences embryo development, gene expression and lipid droplet formation in the porcine cumulus cells. *Biol Reprod* 103(1): 36-48
 20. Lolicato F, Brouwers JF, de Lest CH, Wubbolts R, Aardema H, Priore P, Roelen BA, Helms JB, Gadella BM (2015) The cumulus cell layer protects the bovine maturing oocyte against fatty acid-induced lipotoxicity. *Biol Reprod* 92(1): 16
 21. Aardema H, Lolicato F, van de Lest CH, Brouwers JF, Vaandrager AB, van Tol HT, Roelen BA, Vos PL, Helms JB, Gadella BM (2013) Bovine cumulus cells protect maturing oocytes from increased fatty acid levels by massive intracellular lipid storage. *Biol Reprod* 88(6): 16422
 22. Carro M, Buschiazzi J, Ríos GL, Oresti GM, Alberio RH (2013) Linoleic acid stimulates neutral lipid accumulation in lipid droplets of maturing bovine oocytes. *Theriogenology* 79(4): 687-694
 23. Desmet KL, Van Hoeck V, Gagné D, Fournier E, Thakur A, O'Doherty AM, Walsh CP, Sirard MA, Bols PE, Leroy JL (2016) Exposure of bovine oocytes and embryos to elevated non-esterified fatty acid concentrations: integration of epigenetic and transcriptomic signatures in resultant blastocysts. *BMC Genomics* 17(1): 1004
 24. Ogawa K, Itami N, Ueda M, Kansaku K, Shirasuna K, Kuwayama T, Iwata H (2018) Non-esterified fatty acid-associated ability of follicular fluid to support porcine oocyte maturation and development. *Reprod Med Biol* 17(2): 155-163
 25. Garcia-Herreros M, Simintiras CA, Lonergan P (2018) Temporally differential protein expression of glycolytic and glycogenic enzymes during *in vitro* preimplantation bovine embryo development. *Reprod Fertil Dev* 30(9): 1245-1252
 26. de Andrade Melo-Sterza F, Poehland R (2021) Lipid Metabolism in Bovine Oocytes and Early Embryos under *In Vivo*, *In Vitro*, and Stress Conditions. *Int J Mol Sci* 22(7): 3421
 27. Sudano MJ, Rascado TD, Tata A, Belaz KR, Santos VG, Valente RS, Mesquita FS, Ferreira CR, Araújo JP, Eberlin MN, Landim-Alvarenga FD (2016) Lipidome signatures in early bovine embryo development. *Theriogenology* 86(2): 472-484.e1
 28. Sturmey RG, Reis A, Leese HJ, McEvoy TG (2009) Role of fatty acids in energy provision during oocyte maturation and early embryo development. *Reprod Domest Anim* 44 Suppl 3: 50-58
 29. Annes K, Sudano MJ, Belaz KRA, Tata A, Santos VG, Fonseca Junior AMD, Dos Santos ÉC, Eberlin MN, Milazzotto MP (2019) Lipid characterization of *in vitro*-produced bovine embryos with distinct kinetics of development. *Zygote* 27(6): 413-422
 30. Sudano MJ, Santos VG, Tata A, Ferreira CR, Paschoal DM, Machado R, Buratini J, Eberlin MN, Landim-Alvarenga FD (2012) Phosphatidylcholine and sphingomyelin profiles vary in *Bos taurus indicus* and *Bos taurus taurus in vitro*- and *in vivo*-produced blastocysts. *Biol Reprod* 87(6): 130
 31. González-Serrano AF, Pirro V, Ferreira CR, Oliveri P, Eberlin LS, Heinzmann J, Lucas-Hahn A, Niemann H, Cooks RG (2013) Desorption electrospray ionization mass spectrometry reveals lipid metabolism of individual oocytes and embryos. *PLoS One* 8(9): e74981
 32. Janati Idrissi S, Le Bourhis D, Lefevre A, Emond P, Le Berre L, Desnoës O, Joly T, Buff S, Maillard V, Schibler L, Salvetti P, Elis S (2021) Lipid profile of bovine grade-1 blastocysts produced either *in vivo* or *in vitro* before and after slow freezing process. *Sci Rep* 11(1): 11618
 33. Abe H, Yamashita S, Satoh T, Hoshi H (2002) Accumulation of cytoplasmic lipid droplets in bovine embryos and cryotolerance of embryos developed in different culture systems using serum-free or serum-containing media. *Mol Reprod Dev* 61(1): 57-66
 34. Nagashima H, Kashiwazaki N, Ashman RJ, Grupen CG, Seamark RF, Nottle MB (1994) Removal of cytoplasmic lipid enhances the tolerance of porcine embryos to chilling. *Biol Reprod* 51(4): 618-622
 35. Ferreira CR, Saraiva SA, Catharino RR, Garcia JS, Gozzo FC, Sanvido GB, Santos LF, Lo Turco EG, Pontes JH, Basso AC, Bertolla RP, Sartori R, Guardieiro MM, Perecin F, Meirelles FV, Sangalli JR, Eberlin MN (2010) Single embryo and oocyte lipid fingerprinting by mass spectrometry. *J Lipid Res* 51(5): 1218-1227
 36. Romek M, Gajda B, Krzysztofowicz E, Smorag Z (2010) Changes of lipid composition in non-cultured and cultured porcine embryos. *Theriogenology* 74(2): 265-276
 37. Kajdasz A, Warzych E, Derebecka N, Madeja ZE, Lechniak D, Wesoly J, Pawlak P (2020) Lipid Stores and Lipid Metabolism Associated Gene Expression in Porcine and Bovine Parthenogenetic Embryos Revealed by Fluorescent Staining and RNA-seq. *Int J Mol Sci* 21(18): 6488
 38. Bradley J, Swann K (2019) Mitochondria and lipid metabolism in mammalian oocytes and early embryos. *Int J Dev Biol* (63): 93-103.
 39. Leroy JL, Sturmey RG, Van Hoeck V, De Bie J, McKeegan PJ, Bols PE (2014) Dietary fat supplementation and the consequences for oocyte and embryo quality: hype or significant benefit for dairy cow reproduction? *Reprod Domest Anim* 49(3): 353-361
 40. Libera K, Włodarek J, Warzych E, Cieslak A, Szumacher-Strabel M, Jankowiak T, Lechniak D (2020) Reproductive performance of dairy cows fed a diet supplemented with n-3 polyunsaturated fatty acids – a review. *Ann Anim Sci* 20(4): 1169-1183
 41. Renfree MB, Felton JC (2017) The enigma of embryonic diapause. *Development* 144(18): 3199-3210

Lipid metabolism and developmental potential of mammalian oocytes and embryos

Ewelina Warzych, Piotr Pawlak, Dorota Lechniak✉

Department of Genetics and Animal Breeding, Poznan University of Life Sciences

✉corresponding author: dorota.cieslak@up.poznan.pl

Key words: quality, lipid droplets, fatty acids, biomarker, reproduction, *in vitro*

ABSTRACT

Developmental potential of oocytes and embryos is one of the key factors determining success in reproduction. *In vitro* produced embryos display reduced quality thus development of non-invasive approaches for quality assessment is a priority. Lipid metabolism belongs to fundamental mechanisms affecting reproductive processes and shaping the quality of gametes and embryos. The cytoplasm of oocytes and embryos contains specialized organelles for lipid storage (lipid droplets) whose number and size is species dependent. The growth and maturation of the oocyte/embryo is accompanied by a great fluctuation in lipid quality and quantity which in turn affects their quality and freezing suitability. There is a possibility to modify lipid parameters both *in vivo* and *in vitro* by supplementing fat to diet and culture media. The manuscript presents the current state of knowledge on lipid engagement in the process of quality acquirement by oocytes and embryos of two livestock species – cattle and pig.

