



INSTYTUT GENETYKI
I BIOTECHNOLOGII ZWIERZĄT
Polskiej Akademii Nauk



Krajowy Naukowy
Ośrodek Wiodący

mgr Anna Chołoniewska

WPŁYW WARUNKÓW HODOWLI *IN VITRO* NA ROZWÓJ PRZEDIMPLANTACYJNYCH ZARODKÓW KRÓLIKA

**Autoreferat rozprawy doktorskiej
wykonanej w Zakładzie Embriologii Doświadczalnej
Instytutu Genetyki i Biotechnologii Zwierząt Polskiej Akademii Nauk**

JASTRZĘBIEC, 2020

DYREKTOR INSTYTUTU:

PROF. DR HAB. AGNIESZKA WIERZBICKA

PROMOTORZY PRACY:

PROF. DR HAB. JACEK A. MODLIŃSKI

DR HAB. ANNA PILISZEK (PROMOTOR POMOCNICZY)

RECENZENTKI PRACY:

PROF. DR HAB. DOROTA CIEŚLAK

KATEDRA GENETYKI I PODSTAW HODOWLI ZWIERZĄT

WYDZIAŁ MEDYCyny WETERYNARYJNEJ I NAUK O ZWIERZĘTACH

UNIwersytet PRZYRODniczy w POZNANIU

PROF. DR HAB. MARIA SKRZYSZOWSKA

ZAKŁAD BIOTECHNOLOGII ROZRODU I KRIOKONSERWACJI

INSTYTUT ZOOTECHNIKI – PAŃSTWOWY INSTYTUT BADAWCZY, BALICE K/KRAKOWA

1. Spis treści

2. Wstęp	3
3. Hipoteza.....	4
4. Cel pracy	5
5. Materiały i metody	5
6. Wyniki.....	8
7. Dyskusja.....	40
8. Wnioski	59
9. Piśmiennictwo	59

2. Wstęp

Przedimplantacyjny rozwój zarodków ssaków łożyskowych to okres intensywnych podziałów komórkowych, różnicowania oraz zmian metabolicznych, prowadzących do implantacji zarodka w ścianie macicy i adaptacji do dalszego rozwoju. Jednym z czynników odpowiadających za prawidłowy rozwój zarodka na etapie przedimplantacyjnym jest różnicowanie jego komórek na trzy pierwsze linie komórkowe: epiblast (EPI), endodermę pierwotną (PrE) oraz trofektodermę (TE). Błędy w tym procesie mogą skutkować zahamowaniem rozwoju i obumarciem zarodka na etapie implantacji.

Badanie rozwoju zarodkowego i towarzyszących mu procesów jest możliwe dzięki opracowaniu technik pozaustrojowej hodowli zarodków (IVC, ang. *in vitro culture*), której celem jest zapewnienie optymalnych warunków do prawidłowej realizacji rozwoju poza organizmem samicy. Królik (*Oryctolagus cuniculus*) jest zwierzęciem od lat wykorzystywanym jako model w badaniach rozwoju przedimplantacyjnego ssaków. Warunki hodowli *in vitro* umożliwiające rozwój zarodków królika na etapie przedimplantacyjnym, zostały opracowane ponad 50 lat temu i wciąż są one ulepszane. Warto jednak podkreślić, że warunki w hodowli *in vitro* zarodków królika, podobnie jak innych ssaków, różnią się znacząco od warunków występujących w drogach rodnych samicy a zarodki hodowane pozaustrojowo wykazują wiele rozbieżności w porównaniu z zarodkami rozwijającymi się *in vivo*.

Jak dotąd nie prowadzono badań określających wzorzec różnicowania trzech pierwszych linii komórkowych w zarodkach królika w trakcie rozwoju przedimplantacyjnego oraz porównujących jak powszechnie używane warunki hodowli *in vitro*, takie jak: poziom stężenia tlenu, obecność i rodzaj dodatków białkowych, system hodowli (sekwencyjny lub jednoetapowy) czy współhodowla z komórkami somatycznymi, wpływają na jakość, różnicowanie i determinację losu

komórek w przedimplantacyjnych zarodkach królika. Wiedza ta może pomóc w ocenie, czy dane warunki pozwalają na uzyskanie rozwoju podobnego do obserwowanego *in vivo*.

Ponadto przedimplantacyjny rozwój zarodka jest nierozdzielnie związany z aktywnością szlaków metabolicznych w jego komórkach. W środowisku rozwoju, w tym w hodowli *in vitro* egzogenne substraty metaboliczne, dzięki aktywności odpowiednich ścieżek metabolicznych, stają się źródłem energii oraz substancji niezbędnych do rozwoju zarodka. Ustalenie, które szlaki metaboliczne są aktywne na danym etapie rozwoju zarodkowego królika oraz jaki jest ich wpływ na rozwój jest jednym z kluczowych aspektów zrozumienia wymagań przedimplantacyjnych zarodków królika.

3. Hipoteza

Jednym z celów badań nad warunkami hodowli *in vitro* zarodków ssaków jest pozaustrojowe otrzymanie zarodków jakościowo i morfologicznie jak najbardziej zbliżonych do tych otrzymywanych *in vivo*. Dzięki temu możliwe jest m.in. badanie i poznanie procesów rozwoju przedimplantacyjnego. W przypadku zarodków mysich, których wymagania w okresie przedimplantacyjnym są stosunkowo niewielkie i których rozwój *in vitro* badany jest od ponad 70 lat, metody hodowli pozaustrojowej w okresie przedimplantacyjnym umożliwiają rozwój w sposób zbliżony do rozwoju *in vivo*. Między innymi dzięki temu mechanizmy warunkujące rozwój myszy są najlepiej poznane ze wszystkich ssaków. Jednak przedimplantacyjny rozwój gryzoni różni się pod wieloma względami od rozwoju innych ssaków, zatem konieczne są badania na innych modelach zwierzęcych. Pomimo że królik jest dogodnym modelem do badań z zakresu biologii rozwoju, aspekty hodowli pozaustrojowej zarodków tego gatunku takie jak wpływ hodowli na rozwój i różnicowanie pierwszych linii komórkowych oraz aktywność metaboliczna króliczych zarodków w okresie przedimplantacyjnym, nie zostały dostatecznie poznane.

Zatem, w niniejszej pracy postanowiono zweryfikować następujące hipotezy:

1. Rozwój i różnicowanie pierwszych linii komórkowych w przedimplantacyjnych zarodkach królika hodowanych *in vitro* zależy od czynników środowiskowych takich jak: skład pożywki hodowlanej, system hodowli (sekwencyjny, jednoetapowy lub współhodowla z komórkami somatycznymi), stężenie tlenu i rodzaj dodatków białkowych.
2. Aktywność i niezbędność szlaków metabolicznych (glikolizy, fosforylacji oksydacyjnej, szlaku pentozofosforanowego oraz β -oksydacyjnego) w przedimplantacyjnych zarodkach królika jest skorelowana ze stadium rozwoju zarodkowego.

4. Cel pracy

Zarodki królika wymagają specyficznych warunków rozwoju, które nie są jeszcze dostatecznie poznane, co znacznie ogranicza nasze rozumienie procesów jakie zachodzą w wczesnym rozwoju ssaków, w tym procesów różnicowania się pierwszych linii komórkowych.

Celem pracy było zatem:

Opracowanie i określenie systemu hodowli zarodków króliczych *in vitro*, pozwalającego na przebieg rozwoju zarodków odpowiadający rozwojowi *in vivo*, z zachowaniem ram czasowych, stopnia proliferacji i zróżnicowania komórek.

Cel ten był realizowany poprzez:

1. Określenie modelowego wzorca rozwoju i różnicowania zarodków królika *in vivo*.
2. Analizę aktywności szlaków metabolicznych w przedimplantacyjnych zarodkach królika.
3. Określenie wpływu stężenia tlenu w atmosferze hodowlanej, rodzaju dodatku białkowego w pożywce, systemu hodowli (jednoetapowy, sekwencyjny lub współhodowla z króliczymi komórkami nabłonka jajowodu) na rozwój i morfokinetykę przedimplantacyjnych zarodków króliczych oraz na różnicowanie w zarodkach pierwszych linii komórkowych.

5. Materiały i metody

Do przeprowadzenia doświadczeń użyto zarodków w stadiach przedimplantacyjnych, uzyskanych z królików (*Oryctolagus cuniculus*) rasy Popielniańskiej białej, pochodzących z zarejestrowanej hodowli Instytutu Genetyki i Biotechnologii Zwierząt Polskiej Akademii Nauk w Jastrzębcu (nr użytkownika: 030). W celu uzyskania jak największej liczby zarodków z jednej samicy, królice podawane były stymulacji hormonalnej.

W ramach niniejszej pracy użyto zarodków w następujących stadiach rozwoju: zygota (19-20 hpc – godzin po kryciu, *hours post coitum*), E3.0, E3.25, E3.5, E3.75, E4.0, E5.0, E6.0. Zarodki ze stadiów E3.0, E3.25, E3.5, E3.75, E4.0, E5.0, E6.0 użyte zostały do ustalenia wzorca różnicowania zarodków *in vivo*. Liczba zarodków, użytych do analiz na poszczególnych etapach rozwoju: E3.0 (n=6), E3.25 (n=4), E3.5 (n=4), E3.75 (n=4), E4.0 (n=3), E5.0 (n=2), E6.0 (n=2). Zarodki w stadium zygoty poddano hodowli *in vitro* w celu zbadania jak warunki hodowli *in vitro* wpływają na rozwój i różnicowanie pierwszych linii komórkowych oraz sprawdzenia aktywności szlaków metabolicznych. Warunkami hodowli *in vitro* jakie badano w niniejszej pracy były: stężenie tlenu (21% - atmosferyczne, 5% - nazywane hipoksyjnym (w porównaniu do atmosferycznego) lub

fizjologicznym), dodatki białkowe do pożywek, system hodowli (sekwencyjny i jednoetapowy) oraz hodowla z komórkami somatycznymi. Poniżej znajduje się skrótowy opis wszystkich 3 grup doświadczalnych (wraz z wariantami) oraz grupami kontrolnymi.

1. Hodowla zarodków w pożywce RDH (RPMI:DMEM:Ham's F10, w stosunku 1:1:1¹) z dodatkami białkowymi w dwóch stężeniach tlenu: ~21% O₂ i 5% O₂
 - A. Hodowla w atmosferze ~21% O₂ w powietrzu:
 - a. z dodatkiem 0,3% BSA (*Bovine Serum Albumin, SigmaAldrich, USA*),
 - b. z dodatkiem 10% FBS (*Foetal Bovine Serum, SigmaAldrich, USA*),
 - c. z dodatkiem 10% KSR (*Knockout Serum Replacement, Merck, USA*),
 - d. kontrola – hodowla bez dodatków białkowych.
 - B. Hodowla w atmosferze 5% O₂ w powietrzu:
 - a. z dodatkiem 0,3% BSA,
 - b. z dodatkiem 10% FBS,
 - c. z dodatkiem 10% KSR,
 - d. kontrola – hodowla bez dodatków białkowych.
2. Hodowla zarodków w pożywkach komercyjnych: jednoetapowych i sekwencyjnych
 - A. Pożywki jednoetapowe
 - a. Hodowla w pożywce Global® (wcześniej LifeGlobal, USA, obecnie CooperSurgical, USA):
 - a) Global z dodatkiem białkowym 0,3% BSA (Global+),
 - b) Global bez dodatku białkowego (Global).
 - b. Hodowla w pożywce SAGE 1-step™ (CooperSurgical, USA).
 - c. Kontrola dla pożywek jednoetapowych – hodowla w pożywce RDH:
 - a) z dodatkiem białkowym 0,3% BSA (kontrola JE+),
 - b) bez dodatku białkowego (kontrola JE-).
 - B. Hodowla w pożywkach sekwencyjnych
 - a. Hodowla w pożywce G-1™/G-2™ (Vitrolife, Szwecja):
 - a) G-1/G-2 z dodatkiem białkowym HSA (G1G2+),
 - b) G-1/G-2 bez dodatku białkowego (G1G2).
 - b. Hodowla w pożywce Quinn's Advantage™ Cleavage Medium/Quinn's Advantage™ Blastocyst Medium (QASM) (CooperSurgical, USA):
 - a) QASM z dodatkiem białkowym 0,3% BSA (QASM+).
 - b) QASM bez dodatku białkowego (QASM).
 - c. Hodowla w pożywce ORIGIO® Cleav/ORIGIO® Blast (CooperSurgical, USA).
 - d. Kontrola dla pożywek sekwencyjnych – hodowla z odnowieniem pożywki RDH po 48 hpc:
 - a) z dodatkiem białkowym 0,3% BSA (kontrola SEK+),
 - b) bez dodatku białkowego (kontrola SEK-).
3. Hodowla zarodków z agregatami z króliczego nabłonka jajowodu (ROEC, *rabbit oviductal epithelial cells*). Kontrolą dla tej grupy doświadczalnej była hodowla w pożywce RDH 0,3% BSA z odnowieniem pożywki.

Dodatkowo w pracy zbadano aktywności szlaków metabolicznych niezbędnych dla rozwoju zarodków królika na różnych etapach rozwoju. Aktywność była badana za pomocą inhibitorów blokujących poszczególne szlaki (Tabela 1), dodanych do standardowej pożywki RDH + 0,3% BSA. Zarodki królicze hodowano w pożywce z dodatkiem inhibitorów od stadium zygoty (19-20 *hpc*) lub od stadium moruli (72 *hpc*). Kontrolą dla tej grupy doświadczalnej była hodowla zarodków w pożywce RDH z dodatkiem jednego z trzech rozpuszczalników dla użytych inhibitorów: (metanol, DMSO lub woda do pożywek EMSURE).

Tabela 1. Inhibitory szlaków metabolicznych użyte w doświadczeniu

l.p	Nazwa inhibitora/ grupa doświadczalna	Akronim	Blokowany szlak metaboliczny	Producent/Nr katalogowy	Rozpuszczalnik (rozpuszczalność)
1	Etomoxir	ETMOX	B-oksydacyjny	SigmaAldrich/ E1905-5MG	Woda (6,41mg/ml)
2	Antymycyna-A	ANTY-A	Fosforylacja oksydacyjna (OXPHOS)	SigmaAldrich/A8674-25MG	DMSO (2 mg/ml)
3	2,4-dinitrofenol	2,4-DNF	Fosforylacja oksydacyjna (OXPHOS)	SigmaAldrich/40057	Metanol (5 mg/ml)
4	IACS-010759	IACS	Fosforylacja oksydacyjna (OXPHOS)	Axon Medchem/ B2231-1,5	DMSO (27 mg/ml)
5	2-deoksy-D-glukoza	DDGLU	Glikoliza	SigmaAldrich/D3179- 250MG	Woda (330 mg/ml)
6	Kwas bromopirogronowy	3-BP	Glikoliza	Sigma/16490-10G	Woda (100mg/ml)
7	6-aminonikotynamid	6-AN	Szlak Pentozofosforanowy (PPP)	SigmaAldrich/A68203-1G	DMSO (1 mg/ml)
8	Diphenyleneiodonium	DPI	Szlak Pentozofosforanowy (PPP)	SigmaAldrich/D2926-10MG	DMSO (10 mg/ml)

Zarodki hodowane do stadium 5.0 lub 6.0 *dpc* oraz zarodki uzyskane bezpośrednio poprzez zabieg płukania jajowodu i/lub macicy, były utrwalane w 4% roztworze paraformaldehydu (4% PFA, Formaldehyde Solution, SigmaAldrich, USA) w PBS z dodatkiem 10% Tween (SigmaAldrich, USA; P9416) i 1% Triton X (SigmaAldrich, USA; X100). Następnie mechanicznie usuwano z zarodków osłonki mucynową i przejrzystą.

Głównymi celami niniejszej pracy było określenie wzorca różnicowania zarodków królika *in vivo* oraz wpływu badanych warunków hodowli *in vitro* na różnicowanie pierwszych linii komórkowych w zarodkach królika. Aby uzyskać te cele w utrwalonych, pozbawionych osłonek zarodkach, za pomocą metody immunofluorescencji pośredniej oraz barwienia jąder komórkowych, badano liczbę oraz lokalizację komórek wykazujących obecność w jądrze komórkowym białek, będących markerami poszczególnych linii komórkowych: CDX2 dla TE, SOX2

dla EPI oraz SOX17 dla PrE. Użyto przeciwciał: anti-CDX2 (1:100, BioGenex, USA), anti-SOX2 (1:200, Abcam, UK), anti-SOX17 (1:100, R&D, USA).

W celu zobrazowania białek charakterystycznych dla pierwszych linii komórkowych oraz jąder komórkowych użyto mikroskopu konfokalnego (Nikon A1R, Japonia). Zdjęcia zebrano w stosy po 28-45 skanów uzyskanych wzdłuż osi Z. Umożliwiło to stworzenie obrazu trójwymiarowego i oglądanie zarodków w przekroju na dowolnej głębokości. Analizę obrazów z mikroskopu konfokalnego wykonano przy użyciu programu graficznego IMARIS (Bitplane, Szwajcaria).

Rozwój zarodków w doświadczeniach z użyciem pożywki RDH z dodatkami białkowymi w dwóch stężeniach tlenu monitorowany był przy pomocy systemu Primo Vision EVO+ (Vitrolife). Zygoty, umieszczano w mikrodotkach za pomocą szklanej, zakrzywionej pipety. Zdjęcia poklatkowe zarodków, wzdłuż osi Z, wykonywano co 10 minut przez cały czas hodowli ~ 125 godzin. Powstałe filmy analizowano w programie PrimoVision i VLC media player.

Analizę statystyczną wyników przeprowadzono za pomocą skryptów napisanych w języku Python 3.7.3 z wykorzystaniem bibliotek pandas 0.24.2, numpy 1.16.4 oraz scipy 1.2.1. Metody użyte do analizy poszczególnych doświadczeń opisano poniżej:

- Wpływ stężenia tlenu oraz dodatku białkowego został zbadany także przy użyciu dwuczynnikowej analizy wariancji (ANOVA) z interakcjami. Pierwszy czynnik (stężenie tlenu) działał na dwóch poziomach odpowiadającym stężeniu tlenu w środowisku hodowli (5% oraz 21%). Drugi czynnik obejmuje cztery warianty dodatku białkowego do pożywki RDH (brak dodatku białkowego, BSA, FBS, KSR).
- Wpływ dodatku białkowego na liczbę komórek oraz na średni czas osiągnięcia poszczególnych stadiów rozwoju został sprawdzony za pomocą testu Kruskala-Wallisa i testu post hoc Dunna.
- Wpływ stężenia tlenu oraz dodatku białkowego został zbadany także przy użyciu dwuczynnikowej analizy wariancji (ANOVA).
- Zależności między czasem osiągnięcia poszczególnych stadiów a liczebnością komórek były określane za pomocą współczynnika korelacji rang Spearmana.

6. Wyniki

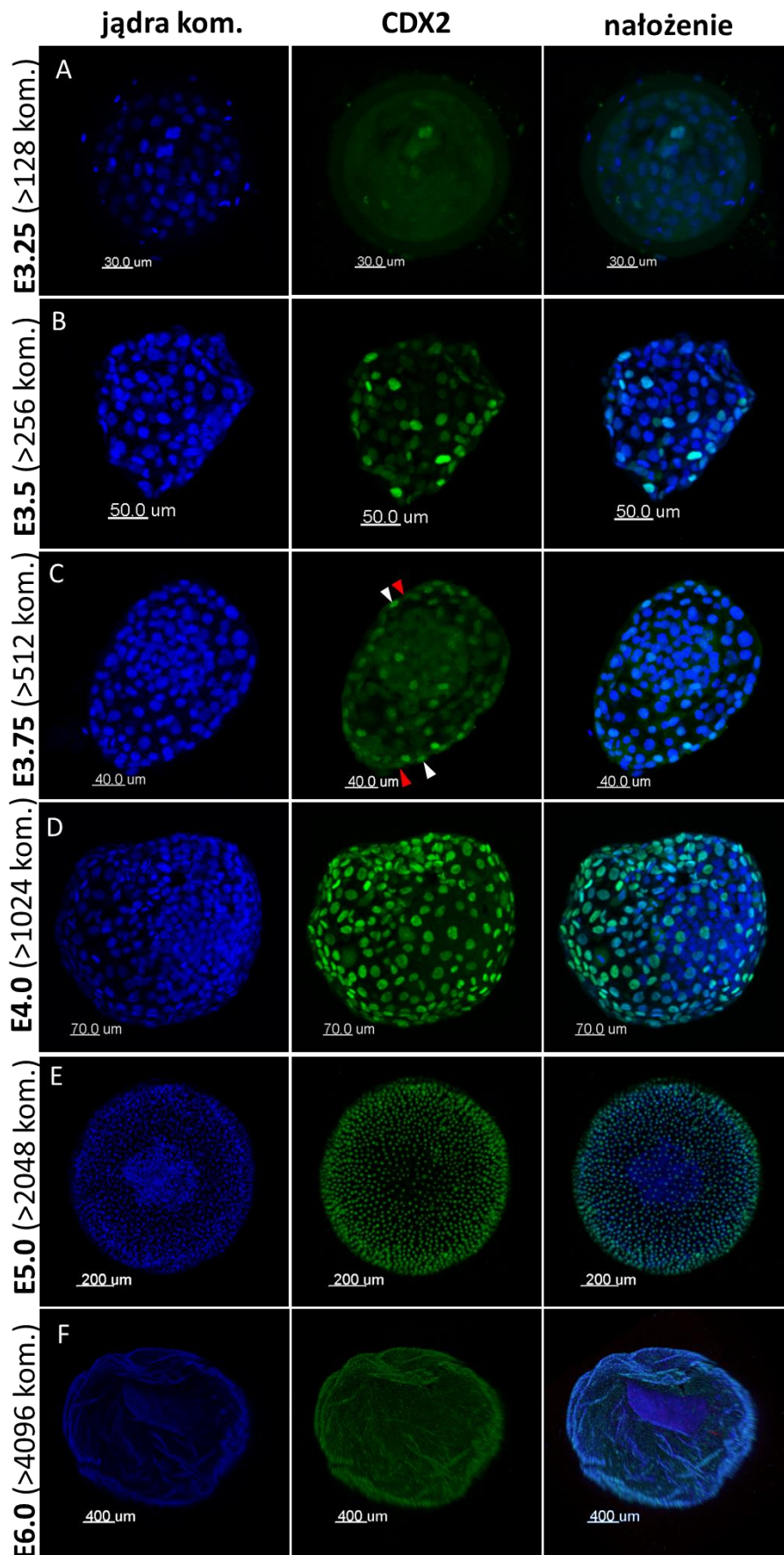
6.1 Różnicowanie pierwszych linii komórkowych w przedimplantacyjnych zarodkach królika

Pierwszymi liniami komórkowymi zarodków ssaków, w tym królika, różnicującymi się w okresie przedimplantacyjnym są: trofektoderma (TE), epiblast (EPI) i endoderma pierwotna (PrE).

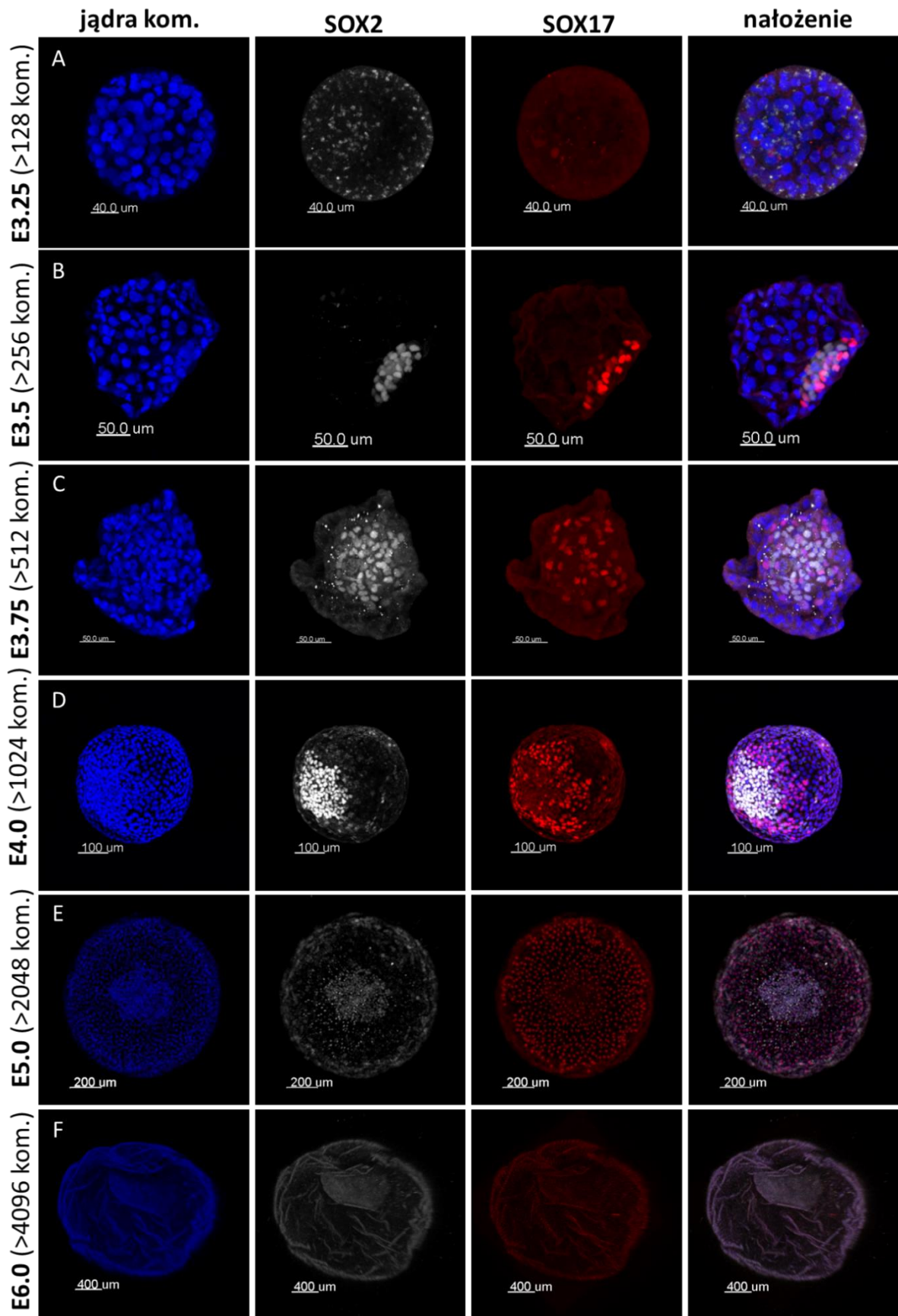
Określenie w jaki sposób poszczególne warunki hodowli *in vitro*, takie jak stężenie tlenu, rodzaj dodatku białkowego, pożywka czy współhodowla z komórkami nabłonka jajowodu, wpływają na różnicowanie komórek może pomóc w identyfikacji, które czynniki najlepiej wpływają na rozwój zarodków i przybliżają go do rozwoju *in vivo*. Jednak aby móc porównywać różnicowane zarodków *in vitro*, konieczne było określenie wzorca różnicowania pierwszych linii komórkowych w zarodkach królika *in vivo*.

Analiza zarodków królika rozwijających się *in vivo* i otrzymanych na poszczególnych stadiach rozwoju: E3.0, E3.25, E3.5, E3.75, E4.0, E5.0, E6.0 wykazała, że pierwsze komórki TE, w których zlokalizowany jest marker CDX2 pojawiają się w stadium wczesnej blastocysty – E3.25 (Rycina 1 – A). W zarodkach w stadium blastocysty E3.5 (Rycina 1 – B) i E3.75 (Rycina 1 – C) obserwujemy sukcesywne zwiększanie się udziału komórek CDX2+ w TE, jednak na tym etapie rozwoju *in vivo* obserwujemy zarówno komórki TE posiadające marker CDX2 (Rycina 1 – C, biały grot) jak i takie, które nie posiadają markera CDX2 w jądrze komórkowym (Rycina 1 – C, czerwony grot). Od stadium E4.0 marker CDX2 obecny jest we wszystkich komórkach TE blastocysty (Rycina 1 – D) i wraz ze zwiększaniem się liczby komórek zarodka, zwiększa się liczba komórek CDX2+ (Rycina 1 – E, F).

W zarodkach królika różnicowanie komórek w kierunku linii endodermy pierwotnej i epiblastu, rozpoczyna się w węźle zarodkowym (ICM) w stadium wczesnej blastocysty. Różnicowanie to zachodzi dwustopniowo. Jako pierwsze, w stadium E3.25 wykrywane są komórki endodermy pierwotnej wykazujące obecność markera SOX17. W tym stadium nie wykazano obecności komórek SOX2+ (Rycina 2 – A). Od stadium E3.5 w ICM zwiększa się liczba komórek SOX17+ oraz pojawiają się komórki SOX2+ (Rycina 2 – B). W ICM, w stadiach E3.5 i E3.75 oba typy komórek: SOX17+ i SOX2+ są obecne i wymieszane między sobą (Rycina 2 – B, C). W stadium E4.0 komórki w ICM przybierają specyficzny sposób uporządkowania, w którym komórki epiblastu – SOX2+ tworzą grupę komórek otoczoną komórkami endodermy pierwotnej – SOX17+. W tym stadium komórki SOX17+ zaczynają migrować lecz nie oddzielają jeszcze komórek epiblastu od jamy blastocysty (Rycina 2 – D). W stadium E5.0 i E6.0 komórki endodermy pierwotnej migrują i tworzą warstwę PrE pod warstwą TE, wyraźnie oddzielając epiblast od jamy blastocysty (Rycina 2 – E, F).

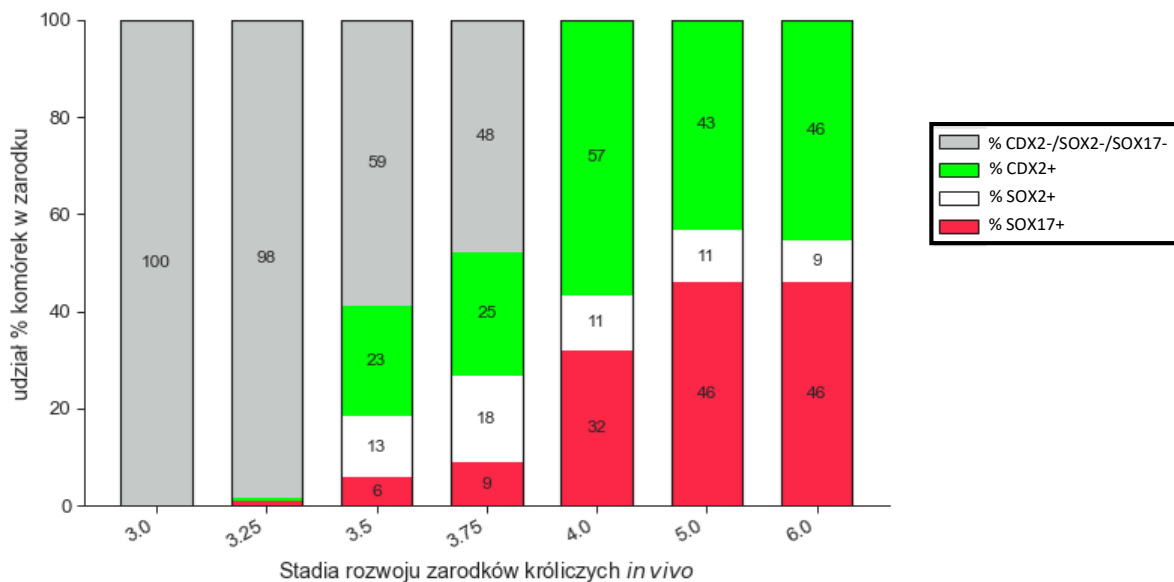


Rycina 1. Różnicowanie linii TE w przedimplantacyjnych zarodkach królika *in vivo*. Pierwsze komórki TE CDX2+ wykrywane są w stadium E3.25 (A). W zarodkach na stadiach E3.5 (B) i E3.75 (C) w TE obecne są komórki CDX2+ (grot biały) oraz komórki CDX2- (grot czerwony). Na stadiach E4.0 (D), E5.0 (E) i E6.0 (F) marker CDX2 obecny jest we wszystkich komórkach TE. Użyte markery: TE-CDX2, jądra komórkowe- barwnik Hoechst (A). Zdjęcia: A, C, D – A. Piliszek, B, E, F – A. Chołoniewska.



Rycina 2. Różnicowanie linii EPI i PrE w przedimplantacyjnych zarodkach królika *in vivo*. Pierwsze komórki PrE (SOX17+) wykrywane są w ICM w stadium E3.25 (A). W stadiach E3.5 (B) i E3.75 (C) w ICM komórki SOX17 i SOX2 są ze sobą przemieszane. W stadium E4.0 (D) w ICM komórki wykazujące obecność markera SOX17 otaczają pierścieniem grupę komórek SOX2. W stadiach E5.0 (E) i E6.0 (F) komórki SOX17 tworzą warstwę komórek pod komórkami TE, natomiast komórki SOX2 usytuowane są na jednym z biegunów blastocysty. Użyte markery linii komórkowych: EPI-SOX2, PrE-SOX17, jądra komórkowe- barwnik Hoechst. Zdjęcia: A, C, D – A. Piliszek, B, E, F – A. Chołoniewska.

Od stadium E3.25 w zarodkach króliczych zwiększa się udział komórek zróżnicowanych. W zarodkach w stadium E3.25 komórki zróżnicowane stanowią jedynie 2% wszystkich komórek zarodka (1% CDX2 i 1% SOX17) a 98% stanowią komórki CDX2-/SOX2-/SOX17-. W zarodkach E3.5 komórki zróżnicowane stanowią około 41% wszystkich komórek, z czego 23% CDX2+, 13% SOX2+ i 6% SOX17+. W zarodkach E3.75 komórki zróżnicowane stanowią 52% wszystkich komórek z czego 25% CDX2+, 18% SOX2+ i 9% SOX17+. W zarodkach E4.0 komórki zróżnicowane stanowią 100% wszystkich komórek, z czego najwięcej jest komórek CDX2+ (57%), komórki SOX2+ stanowią 11% a SOX17+ 32%. W zarodkach E5.0 i E6.0, komórki CDX2 stanowią około 45% wszystkich komórek zarodka, podobnie jak komórki SOX17 (46%), natomiast komórki SOX2+ stanowią kolejno 11% i 9% wszystkich komórek zarodka.



Wykres 1. Udział procentowy komórek wykazujących obecność markerów linii: trofektodermi – CDX2, epiblastu – SOX2 oraz endodermy pierwotnej – SOX17, w zarodkach królika rozwijających się *in vivo*, pozyskanych na stadiach rozwoju: E3.0, E3.25, E3.5, E3.75, E4.0, E5.0, E6.0.

Markery pierwszych linii komórkowych: CDX2, SOX2 oraz SOX17, obecne są w zarodkach króliczych od stadium wczesnej blastocysty. Marker trofektodermi – CDX2 oraz marker endodermy pierwotnej – SOX17 pojawiają się w pojedynczych komórkach zarodka w stadium E3.25. W stadium E3.5 zaczyna być wykrywany marker komórek epiblastu – SOX2. Od stadium E3.25 do stadium E4.0, w zarodkach obecne są także komórki nie posiadające markerów pierwszych linii komórkowych, jednak wraz z rozwojem zarodka ich udział procentowy maleje. Od stadium E4.0, każda komórka zarodka należy do jednej z trzech linii komórkowych TE, EPI lub PrE.

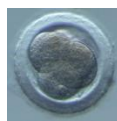
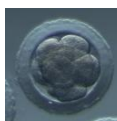




6.2 Aktywność szlaków metabolicznych w rozwoju przedimplantacyjnym zarodków królika

Jednym ze szlaków metabolicznych dostarczającym substratów w do produkcji ATP w zarodkach ssaków jest szlak β -oksydacyjny. Aktywność szlaku β -oksydacyjnego nie była do tej pory badana w

zarodkach króliczych. W celu zbadania aktywności szlaku β -oksydacyjnego, wykorzystano inhibitor etomoxir (ETMOX), blokujący białko CPT1B na zewnętrznej błonie mitochondrium.

W grupie hodowanej z ETMOX w rozcieńczeniu 0,1 – 57% zarodków osiągnęło stadium 2- lub 4-komórkowe i nie podjęło dalszego rozwoju, natomiast w grupach: 0,0001, 0,001, 0,01 odpowiednio 89%, 100% i 88% zarodków przeszło proces kompaktacji, 89%, 94%, 81% osiągnęło stadium moruli, a 89%, 69%, 44% zarodków wytworzyło jamkę i rozwinęło się do stadium blastocysty (Tabela 2). W porównaniu z grupą kontrolną, w której 90% zarodków rozwinęło się do stadium blastocysty zauważono, że ETMOX w rozcieńczeniu 0,0001, nie wpływa na aktywność szlaku β -oksydacyjnego. Natomiast ETMOX w rozcieńczeniach 0,001 i 0,01 zmniejsza procent uzyskanych blastocyst, co może wskazywać na istotną rolę szlaku β -oksydacyjnego w dostarczaniu energii użytecznej w procesie kawitacji.

Tabela 2. Aktywność szlaku β -oksydacyjnego w przedimplantacyjnych zarodkach królika. W tabeli 9 przedstawiono procent zarodków, hodowanych w obecności inhibitora szlaku metabolicznego β -oksydacyjnego, które w czasie obserwacji, czyli 48, 72, 96 i 120 hpc osiągnęły dane stadium rozwoju. Użyty inhibitor: Etomoxir (ETMOX)

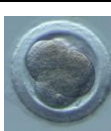
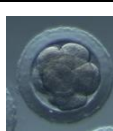
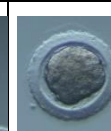
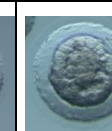

HODOWLA ZARODKÓW Z INHIBITOREM SZLAKU B-OKSYDACYJNEGO									
Inhibitor	Rozcieńczenie	Stadium w hodowli	I. zarodków	stadium 2-/4-komórkowe	kompaktacja	Morula	Kawitacja	blastocysta	
KONTROL A-Emsure	0,001	Zygota	29	100%	100%	97%	93%	90%	
ETMOX	0,0001	Zygota	9	100%	89%	89%	89%	89%	
ETMOX	0,001	Zygota	16	100%	100%	94%	69%	69%	
ETMOX	0,01	Zygota	16	100%	88%	81%	44%	44%	
ETMOX	0,1	Zygota	7	57%	0%	0%	0%	0%	

Glikoliza jest jednym z kluczowych szlaków metabolicznych wykorzystywanym przez komórki do produkcji energii w postaci ATP oraz innych substratów niezbędnych w procesach metabolicznych m.in. pirogronianu i NADH. W celu potwierdzenia czy w RDH – standardowej pożywce wykorzystywanej w Zakładzie Embriologii Doświadczalnej IGBZ, uzyskamy podobne wyniki dotyczące aktywności i wpływu szlaku glikolizy na rozwój zarodków króliczych, co inne grupy badawcze ², użyto dwóch inhibitorów: 2-deoksyglukozy (DDGLU) i kwasu 3-bromopirogronowy (3-BP).

Aktywność DDGLU zbadano wykorzystując 3 rozcieńczenia inhibitora: 0,001, 0,01 i 0,1. W grupie DDGLU odpowiednio 78%, 94%, 100% rozwinęło się do stadium moruli a 78%, 59%, 63% osiągnęło stadium blastocysty (Tabela 3). Zarodki, które nie rozwinęły się do stadium moruli, zatrzymały się w rozwoju w stadium zygoty.

W grupie 3-BP hodowano zarodki w 2 rozcieńczeniach inhibitora: 0,001 i 0,01. W grupie 0,001 – 100% zarodków rozwinęło się do stadium blastocysty, natomiast w grupie 0,01 69% zarodków rozwinęło się do stadium blastocysty. Otrzymane wyniki wskazują, że w zarodkach królika na etapie bruzdkowania szlak glikolizy nie jest niezbędny dla rozwoju zarodka. Natomiast wydaje się, że od stadium moruli, zablokowanie szlaku glikolizy niekorzystnie wpływa na rozwój zarodków. Efekt ten jednak nie jest radykalny, mimo użycia wysokiego stężenia inhibitora - 0,1 (DDGLU) i 0,01 (3-BP).

Tabela 3. Aktywność szlaku glikolizy w przedimplantacyjnych zarodkach królika. W tabeli przedstawiono procent zarodków, hodowanych w obecności inhibitorów szlaku metabolicznego – glikolizy, które w czasie obserwacji, czyli po 48, 72, 96 i 120 hpc w osiągnęły określone stadium rozwoju. Użyte inhibitory: 2-deoksyglukoza (DDGLU), kwas bromopirogronowy (3-BP).

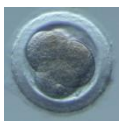
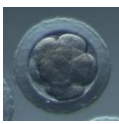
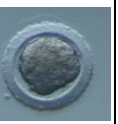
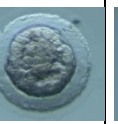

HODOWLA ZARODKÓW Z INHIBITORAMI GLIKOLIZY								
Inhibitor	Rozcieńczenie	stadium w hodowli	l. zarodków	stadium 2-/4-komórkowe	kompakcja	morula	kawitacja	blastocysta
KONTROLA - Emsure	0,001	Zygota	29	100%	100%	97%	93%	90%
DDGLU	0,001	Zygota	9	100%	78%	78%	78%	78%
DDGLU	0,01	Zygota	17	100%	94%	94%	59%	59%
DDGLU	0,1	Zygota	16	100%	100%	100%	63%	63%
3-BP	0,001	Zygota	18	100%	100%	100%	100%	89%
3-BP	0,01	Zygota	13	100%	92%	77%	69%	69%

Szlak pentozofosforanowy (PPP) jest ściśle związany ze szlakiem glikolizy. Produkty glikolizy kierowane są jako substraty do tworzenia NADPH oraz rybozo-5-fosforanu (R5P) i ksylulozo-5-fosforanu (X5P) w szlaku PPP. W celu zbadania aktywności szlaku pentozofosforanowego (PPP) użyto dwóch inhibitorów: DPI (diphenyleneiodonium^{3,4}) i 6-AN (6-aminonikotynamid⁵⁻⁷).

Zarodki hodowane w inhibitorze DPI, zarówno w rozcieńczeniu 0,0001 jak i 0,00001 nie podejmują podziałów komórkowych i obumierają w stadium zygoty. Podobny efekt zaobserwowano jeśli hodowlę w inhibitorze DPI rozpoczęto od stadium moruli (Tabela 4).

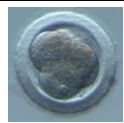
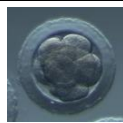
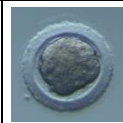
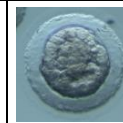
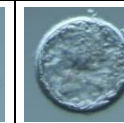
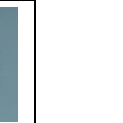
W grupie hodowanej z 6-AN użyto inhibitora w dwóch rozcieńczeniach: 0,000002 i 0,00002. W grupie 6-AN w rozcieńczeniu 0,000002 – 88% zarodków rozwinęło się do stadium moruli, 75% zarodków rozpoczęło kwitację a 50% zarodków rozwinęło się do stadium blastocysty. W grupie 0,00002 – 86% zarodków rozwinęło się do stadium blastocysty. Uzyskane wyniki są niejednoznaczne. Hodowla z wykorzystaniem inhibitora DPI, wskazuje na istotną rolę szlaku PPP w rozwoju zarodków królika. Natomiast hodowla z wykorzystaniem inhibitora 6-AN w rozcieńczeniu 0,000002, wpływa zmniejszenie ilości uzyskanych w hodowli blastocyst (50%), jednak efekt jest słabszy niż w przypadku DPI (0%).

Tabela 4. Aktywność szlaku pentozofosforanowego (PPP) w przedimplantacyjnych zarodkach królika. W tabeli przedstawiono procent zarodków, hodowanych w obecności inhibitorów szlaku metabolicznego – pentozofosforanowego (PPP), które w czasie obserwacji, czyli 48, 72, 96 i 120 hpc w osiągnęły określone stadium rozwoju. Użyte inhibitory: diphenyleiodonium (DPI), 6-aminonikotynamid (6-AN).

HODOWLA ZARODKÓW Z INHIBITORAMI SZLAKU PENTOZOFOSFORANOWEGO								
Inhibitor	Rozcieńczenie	stadium w hodowli	I. zarodków	stadium 2-/4-komórkowe	kompakcja	morula	kawitacja	Blastocysta
KONTROLA -DMSO	0,001	zygota	24	100%	96%	67%	33%	33%
DPI	0,00001	zygota	16	0%	0%	0%	0%	0%
DPI	0,0001	zygota	16	0%	0%	0%	0%	0%
DPI	0,00001	morula	8	–	–	100%	0%	0%
DPI	0,0001	morula	8	–	–	100%	0%	0%
6-AN	0,0000002	zygota	8	100%	88%	88%	75%	50%
6-AN	0,000002	zygota	7	100%	86%	86%	86%	86%

Fosforylacja oksydacyjna (OXPHOS) obok glikolizy, jest jednym z głównych szlaków, w którym z pirogronianu pozyskiwana jest energia oraz substraty niezbędne do rozwoju komórek. W celu zbadania aktywności szlaku fosforylacji oksydacyjnej (OXPHOS), zostały zastosowane 3 inhibitory: antymycyna A (ANTY-A), 2,4-dinitrofenol (2,4-DNF) oraz IACS-010759 (IACS). Rozpuszczalnikiem dla inhibitorów ANTY-A i IACS, było DMSO, zatem grupę kontrolną dla tych inhibitorów stanowiła hodowla w pożywce RDH z dodatkiem DMSO (rozcieńczenie 0,001). Rozpuszczalnikiem 2,4-DNF, był metanol, zatem grupę kontrolną dla hodowli z tym inhibitorem stanowiła hodowla w pożywce RDH z dodatkiem metanolu (rozcieńczenie 0,01). Aktywność OXPHOS, badana była w zarodkach na hodowanych od stadium zygoty i moruli.

Tabela 5. Aktywność szlaku fosforylacji oksydacyjnej (OXPHOS) w przedimplantacyjnych zarodkach królika. W tabeli przedstawiono procent zarodków, hodowanych w obecności inhibitorów szlaku metabolicznego – fosforylacji oksydacyjnej (OXPHOS), które w czasie obserwacji, czyli 48, 72, 96 i 120 hpc w osiągnęły określone stadium rozwoju. Użyte inhibitory: antymycyna-A (ANTY-A), IACS-010759 (IACS), 2,4-dinitrofenol (2,4-DNF).

HODOWLA ZARODKÓW Z INHIBITORAMI SZLAKU FOSFORYLACJI OKSYDACYJNEJ									
Inhibitor	Stężenie	stadium w hodowli	l. zarodków	stadium 2- /4- komórkowe	kompakcja	morula	kawitacja	Blastocysta	
KONTROLA - DMSO	0,001	zygota	24	100%	96%	67%	33%	33%	
ANTY-A	0,0001	zygota	17	18%	0%	0%	0%	0%	
ANTY-A	0,001	zygota	18	22%	0%	0%	0%	0%	
ANTY-A	0,0001	morula	7	–	–	100%	0%	0%	
ANTY-A	0,001	morula	15	–	–	100%	0%	0%	
IACS	0,0001	zygota	8	100%	88%	88%	75%	63%	
IACS	0,001	zygota	15	87%	60%	60%	47%	40%	
IACS	0,001	morula	7	–	–	100%	71%	28%	
KONTROLA - metanol	0,01	zygota	25	100%	92%	92%	60%	60%	
2,4-DNF	0,001	zygota	10	90%	0%	0%	0%	0%	
2,4-DNF	0,01	zygota	8	50%	0%	0%	0%	0%	
2,4-DNF	0,001	morula	7	–	–	100%	57%	57%	

W grupie ANTY-A zarodki w dwóch stadiach rozwoju, hodowano w rozcieńczeniach: 0,0001 oraz 0,001. Około 80% zarodków hodowlanych od zygoty nie podjęło rozwoju i zatrzymało się w tym stadium. Zarodki hodowane od moruli również nie podjęły rozwoju i obumarły (Tabela 5).

W grupie 2,4-DNF użyto dwóch rozcieńczeń: 0,001 oraz 0,01. Odpowiednio 90% i 50% zarodków hodowanych od stadium zygoty rozwinęło się do stadium 2-4-komórkowego lecz nie podjęło dalszego rozwoju. W grupie hodowanej od moruli 57% zarodków rozwinęło się do stadium blastocysty (Tabela 5).

Inhibitor IACS nie był do tej pory stosowany do inhibicji OXPHOS w zarodkach. W celu zbadania aktywności IACS na OXPHOS, użyto inhibitora w 2 rozcieńczeniach: 0,0001 i 0,001. Kiedy użyto IACS w rozcieńczeniu 0,0001, liczba zarodków osiągających poszczególne stadia rozwoju malała: 88% zarodków rozwinęło się do stadium moruli, 75% zarodków rozpoczęło proces kawitacji a 63% zarodków rozwinęło się do stadium blastocysty. Podobnie było w grupie 0,001: 60% rozpoczęło kompaktację i rozwinęło się do stadium moruli, 47% zarodków rozpoczęło kawitację a 40% zarodków rozwinęło się do stadium blastocysty (Tabela 5). Jednak podobny wynik co w grupie 0,001 IACS, otrzymano w grupie kontrolnej o takiej samej zawartości DMSO, co może wskazywać na cytotoksyczny efekt samego DMSO, a nie użytego inhibitora. Powyższe wyniki wskazują, że szlak fosforylacji oksydacyjnej w zarodkach

królika jest aktywny od stadium zygoty i może być zablokowany przez inhibitory: antymycynę-A oraz 2,4-dinitrofenol.

Rozwój przedimplantacyjnych zarodków królika hodowanych *in vitro*, podobnie jak innych ssaków, na etapie bruzdkowania (do stadium moruli) kontrolowany jest przez szlak fosforylacji oksydacyjnej. Od stadium moruli (72 hpc) wzrasta aktywność innych szlaków metabolicznych: glikolizy oraz szlaku β -oksydacyjnego.

6.3 Analiza wpływu poziomu stężenia tlenu i rodzaju dodatku białkowego na rozwój i różnicowanie przedimplantacyjnych zarodków królika w warunkach hodowli *in vitro*

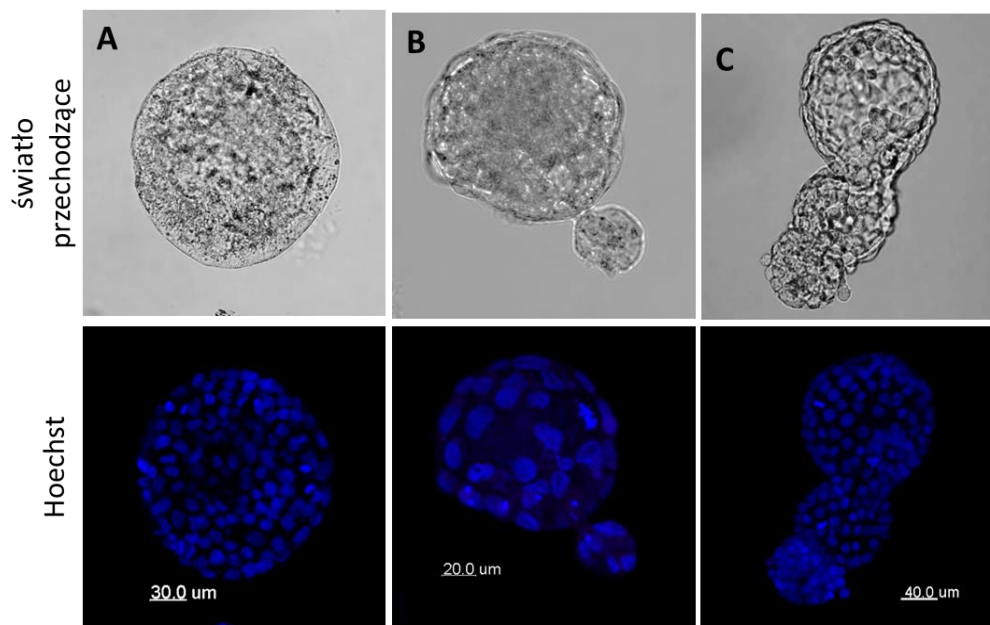
W celu zbadania wpływ poziomu stężenia tlenu i rodzaju dodatku białkowego na rozwój i różnicowanie zarodków królika w hodowli *in vitro*, zarodki od stadium zygoty hodowano w jednym z dwóch stężeń tlenu: 5% oraz atmosferycznym (~21%); wykorzystując do hodowli pożywkę RDH suplementowaną jednym z trzech dodatków białkowych: BSA, FBS lub KSR. Kontrolą doświadczenia była hodowla zarodków w pożywce RDH bez dodatku białkowego. Zarodki hodowano przez 124-126 godzin, do osiągnięcia stadium 6 dpc. Zarodki, które osiągnęły stadium blastocysty poddano barwieniu immunocytochemicznemu na obecność markerów linii komórkowych TE - CDX2, EPI - SOX2 oraz PrE – SOX17.

Dodatkowo część zarodków poddano analizie morfokinetycznej wykorzystując dane z filmów poklatkowych wykonywanych metodą time-lapse. Zarodki, których użyto do analizy morfokinetyki hodowane były w dwóch stężeniach tlenu 5% lub 21%, w pożywce RDH suplementowanej jednym z dwóch dodatków białkowych: BSA lub KSR. Grupę kontrolą doświadczenia stanowiła hodowla w pożywce RDH bez dodatków białkowych.

Otrzymane dane pozwoliły na scharakteryzowanie wpływu poszczególnych warunków hodowli *in vitro* na rozwój zarodków króliczych. Następnie za pomocą analizy wariancji określono wpływ poszczególnych czynników: (stężenie tlenu i rodzaj dodatku białkowego) oraz ich interakcji na różnicowanie zarodków. Dane uzyskane z filmów poklatkowych posłużyły do analizy korelacji między czasem osiągnięcia poszczególnych stadiów rozwojowych a różnicowaniem zarodków. Końcowym etapem badań było porównanie pod względem różnicowania komórek pierwszych linii komórkowych zarodków hodowanych *in vitro* z zastosowaniem badanych czynników z zarodkami rozwijającymi się *in vivo*.

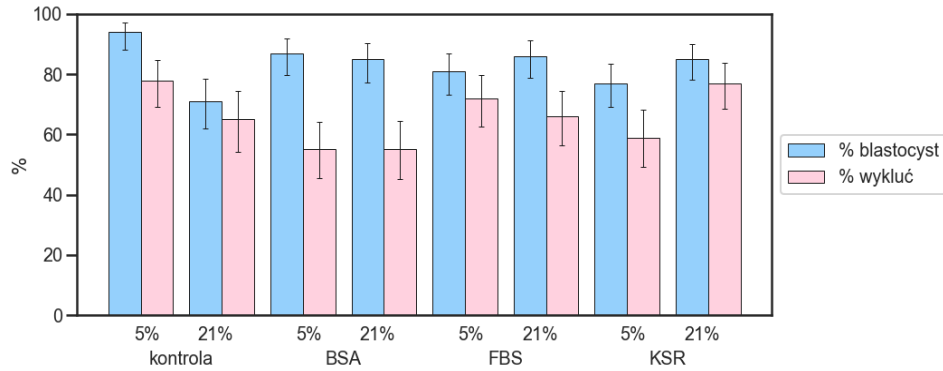
W trakcie badań zaobserwowano, że zarodki królika hodowane *in vitro* nie wykluwały się (Rycina 3 – A) lub wykluwały się z osłonek częściowo (Rycina 3 – B, C), co skutkowało zjawiskiem określanym jako „wyklucie ósemkowe” (*8 shape hatching* – Rycina 3 – B) lub „przepuklina” (*herniation* – Rycina 3 – C) ^{8,9}.

W warunkach ~21% stężenia O₂, w grupie kontrolnej 71% zarodków osiągnęło stadium blastocysty, natomiast we wszystkich trzech grupach z dodatkami białkowymi: BSA, FBS i KSR, około



Rycina 3. Morfologia zarodków królika hodowanych *in vitro*. Zarodki osiągały stadium blastocysty niewyklutej (A) lub wyklutej (B, C). Zarodki utrwalone, mechanicznie pozbawione osłonek.

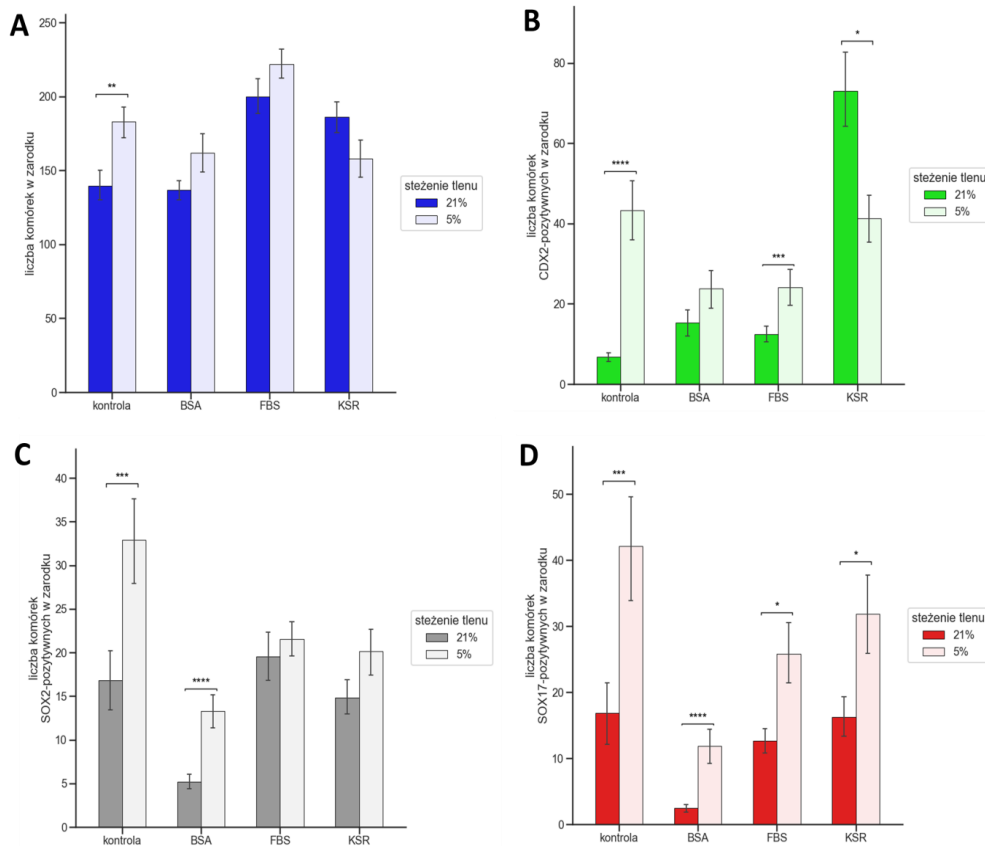
85% osiągnęło stadium blastocysty (Wykres 2, stężenie tlenu: 21%, kolumny błękitne). Ponadto w grupie kontrolnej 65% zarodków wykluło się, natomiast w grupach z dodatkami białkowymi: BSA, FBS i KSR, wykluło się odpowiednio 55%, 67% i 77% zarodków (Wykres 2, stężenie O₂: 21%, kolumny różowe). W warunkach 5% stężenia O₂, grupie kontrolnej 94% zarodków osiągnęło stadium blastocysty, natomiast w grupach z dodatkami białkowymi: BSA – 87% zarodków, FBS – 81% zarodków i KSR – 77% zarodków osiągnęło stadium blastocysty (Wykres 1, stężenie tlenu: 5%, kolumny błękitne). Ponadto w grupie kontrolnej 78% zarodków wykluło się, natomiast w grupach z dodatkami białkowymi: BSA, FBS i KSR, wykluło się odpowiednio 55%, 72% i 59% zarodków (Wykres 2, stężenie tlenu: 5%, kolumny różowe).



Wykres 2. Procent zarodków królika hodowanych od stadium zygoty do stadium 6 dpc, które osiągnęły stadium blastocysty oraz procent zarodków wyklutych. Hodowla prowadzona była w pożywce RDH z jednym z trzech dodatków białkowych (BSA, FBS, KSR) lub bez dodatku białkowego (kontrola) oraz w dwóch stężeniach tlenu: 5% i 21%. Słupki niepewności oznaczają 68% przedział ufności dla odsetka obliczony metodą Wilsona.

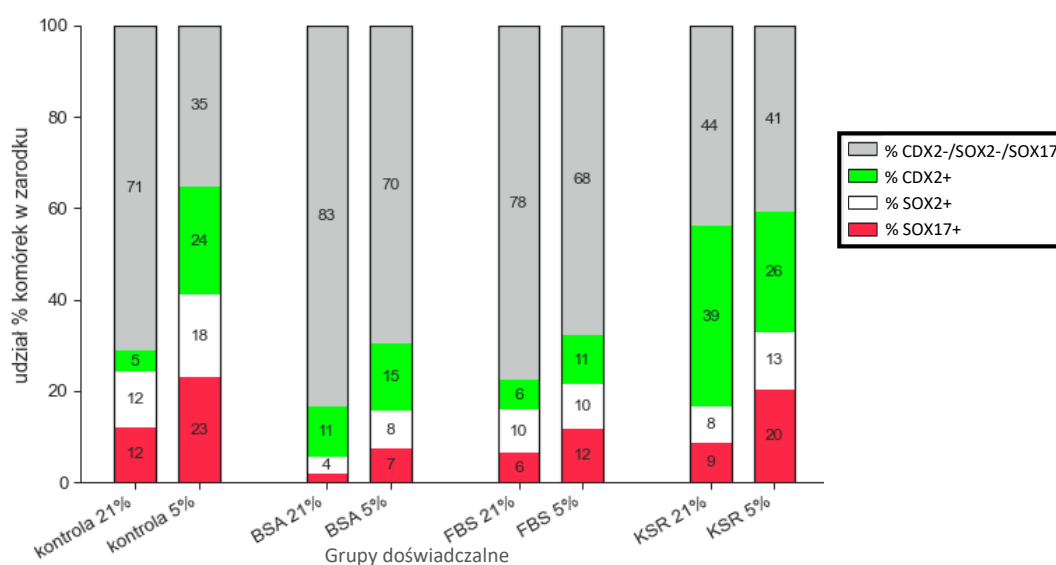
Najwięcej zarodków (94%) rozwinęło się do stadium blastocysty i wykluło (78%) przy zastosowaniu w hodowli pożywki RDH bez dodatku białkowego, w warunkach 5% stężenia tlenu.

Zarodki, które osiągnęły stadium blastocysty analizowane były pod względem całkowitej liczby komórek (Wykres 3, A) oraz markerów pierwszych linii komórkowych: TE (CDX2 – Wykres 3, B); EPI (SOX2 – Wykres 3, C); PrE (SOX17 – Wykres 3, D).



Wykres 3. Udział procentowy komórek niezróżnicowanych (kolor szary) i zróżnicowanych na trzy pierwsze linie komórkowe: TE-CDX2 (kolor zielony), EPI-SOX2 (kolor biały), PrE-SOX17 (kolor czerwony) w zarodkach hodowanych w dwóch stężeniach tlenu, w pożywce RDH z jednym z trzech dodatków białkowych: BSA, FBS, KSR lub bez dodatków (kontrola).

W przedimplantacyjnych zarodkach królika rozwijających się *in vitro*, określono udział procentowy poszczególnych linii komórkowych w zarodkach z każdej grupy doświadczalnej: kontrola 21% i 5%, BSA 21% i 5%, FBS 21% i 5% oraz KSR 21% i 5% (Wykres 4). Zarodki hodowane w 5% stężeniu O₂ miały średnio większy udział, komórek zróżnicowanych w porównaniu z zarodkami hodowanymi w ~21% stężeniu O₂, zarówno w kontroli (65% vs. 29%) jak i przy zastosowaniu któregośkolwiek z dodatków białkowych: BSA (30% vs. 17%), FBS (32% vs. 22%) lub KSR (59% vs. 56%) (Wykres 4). Największy udział komórek CDX2+ obserwowano w grupie KSR hodowanej w ~21% stężeniu O₂ (39%). Największy udział komórek SOX2+ i SOX17+ obserwowano w grupie kontrolnej hodowanej w 5% stężeniu O₂ (18% i 23%).



Wykres 4. Średnia całkowita liczba komórek (A) oraz komórek wykazujących obecność markerów poszczególnych linii komórkowych: CDX2 – trofektoderma (B), SOX2 – epiblast (C) i SOX17 – endoderma pierwotna (D), w zarodkach hodowanych w dwóch stężeniach tlenu oraz w pożywce RDH z dodatkiem białkowym (BSA, FBS i KSR) lub bez dodatku (kontrola). p-wartość: **** – $p < 0,001$; *** – $p < 0,005$; ** – $p < 0,01$; * – $p < 0,05$; . – $p < 0,1$ (test Kruskala–Wallisa).

Hodowla zarodków króliczych w pożywce RDH w 5% stężeniu O₂ ma wpływ na zwiększenie ogólnej liczby komórek zarodków oraz liczby komórek CDX2+, SOX2+ i SOX17+ w porównaniu z hodowlą w ~21% stężeniu O₂. Ponadto zauważono, że mimo osiągnięcia stadium blastocysty 6 dpc, zarodki królicze hodowane *in vitro* składają się w znacznej liczbie z komórek niewykazujących obecności markerów CDX2, SOX2 i SOX17. Warunki, w których stwierdzono największy procent komórek zróżnicowanych to: hodowla bez dodatku białkowego w tlenie o stężeniu 5% (65%), hodowla z dodatkiem KSR w 5% stężeniu O₂ (59%) oraz hodowla z dodatkiem KSR w ~21% stężeniu O₂ (56%). Dodatek KSR „niweluje” negatywny wpływ hodowli w 21% stężeniu tlenu.

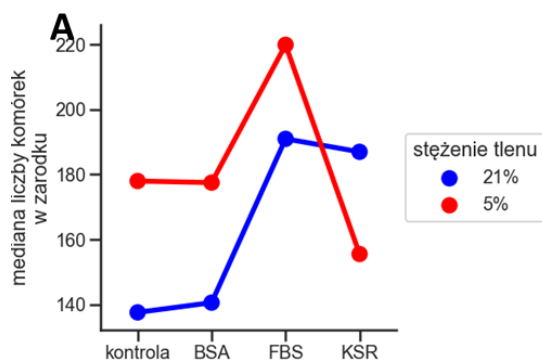
W celu zbadania hipotezy o wpływie stężenia tlenu (czynnik 1) i rodzaju dodatku białkowego (czynnik 2), oraz wpływie interakcji między tymi czynnikami na rozwój zarodków, przeprowadzono

analizę statystyczną z wykorzystaniem dwuczynnikowej analizy wariancji (ANOVA). Analizie podlegał wpływ czynników na: całkowitą liczbę komórek w zarodkach (Wykres 5 – A), oraz liczbę komórek wykazujących obecność markerów poszczególnych linii komórkowych: CDX2 (Wykres 5 – B), SOX2 (Wykres 5 – C), SOX17 (Wykres 5 – D). Na Wykresie 5, w tabelach znajdują się liczby stopni swobody (*df*), wartości statystyki F (*F*) oraz *p*-wartości ($PR>F$) dla wykonanej 2-czynnikowej analizy wariancji (ANOVA), zaś na wykresach przedstawiono występowanie (linie czerwona i niebieska przecinają się) lub brak (nieprzecinające się linie czerwona i niebieska) interakcji między czynnikami.

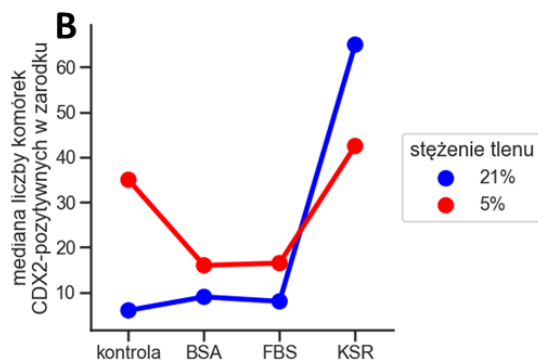
Jak wynika z analizy wariancji, na całkowitą liczbę komórek zarodka wyraźny wpływ ma użycie wybranego dodatku białkowego ($p<10^{-6}$), zaś zarówno wpływ poziomemu tlenu ($p<0,05$), jak i wpływ interakcji między badanymi czynnikami były na granicy istotności statystycznej ($p<0,05$) (Wykres 5 – A). Analiza wykresu interakcji wskazuje na zwiększenie całkowitej liczby komórek w zarodku przy zastosowaniu 5% stężenia O_2 w grupach: kontrolnej, BSA i FBS (Wykres 5 – A).

Statystycznie istotny wpływ na liczbę komórek CDX2+ ma rodzaj zastosowanego dodatku białkowego ($p<10^{-13}$) oraz interakcji między dodatkiem białkowym a stężeniem tlenu ($p<10^{-6}$), lecz nie ma podstaw do uznania wpływu stężenia tlenu za znaczący ($p<0,05$). Analiza wykresu interakcji wskazuje na zwiększenie liczby komórek CDX przy zastosowaniu 5% stężenia O_2 w hodowli zarodków bez dodatku białkowego lub z dodatkiem BSA i FBS zaś nie dla KSR. (Wykres 5 – B).

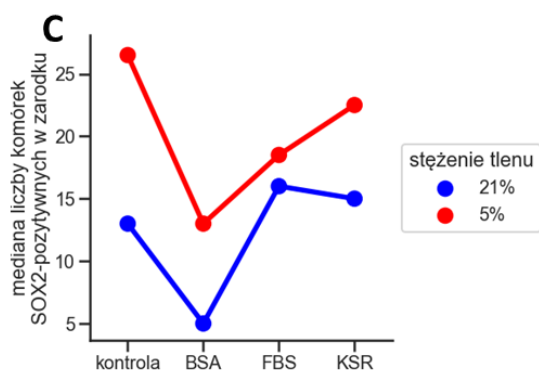
W przypadku SOX2 i SOX17 zarówno stężenie tlenu (odpowiednio: $p<10^{-4}$, 10^{-6}), jak i rodzaj dodatku białkowego w pożywce były istotne statystycznie (odpowiednio: $p<10^{-7}$, 10^{-4}). Interakcje między badanymi czynnikami nie były istotne statystycznie ($p<:0,05$ w obu przypadkach). Zastosowanie 5% stężenia O_2 w warunkach hodowli wyraźnie zwiększa w zarodkach liczbę komórek SOX2 (Wykres 5 – C) i SOX17 (Wykres 5 – D).



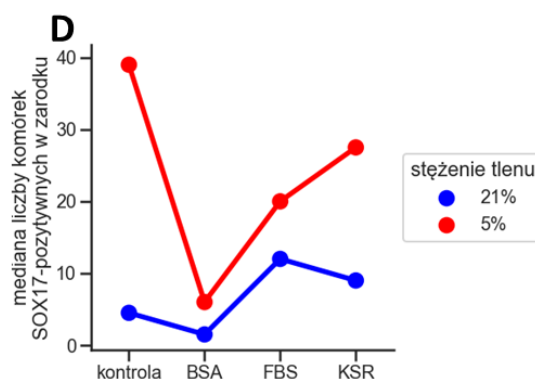
Całkowita liczba komórek			
	df	F	PR(>F)
Tlen	1	4,03888	0,0459087
Dodatek białkowy	3	12,6353	1,49E-07
Tlen:dodatek białkowy	3	3,61338	0,0143321



CDX2			
	df	F	PR(>F)
Tlen	1	0,391637	0,532207
Dodatek białkowy	3	25,944	4,57E-14
Tlen:dodatek białkowy	3	12,4629	1,83E-07



SOX2			
	df	F	PR(>F)
Tlen	1	18,4497	2,81E-05
Dodatek białkowy	3	13,0692	8,79E-08
Tlen:dodatek białkowy	3	1,52143	0,210402

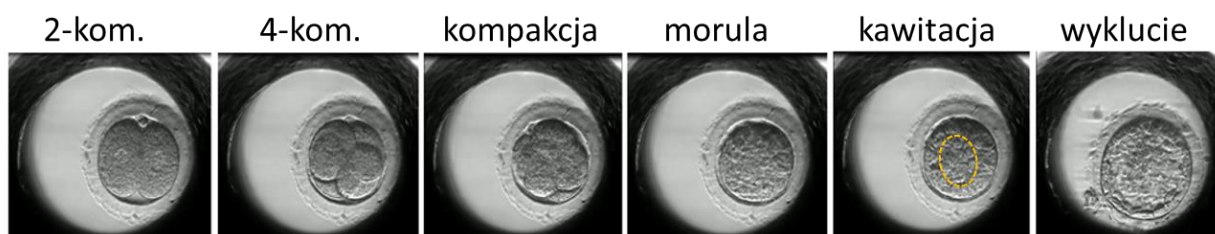


SOX17			
	df	F	PR(>F)
Tlen	1	26,001	8,36E-07
Dodatek białkowy	3	9,04387	1,28E-05
Tlen:dodatek białkowy	3	1,18982	0,314959

Wykres 5. Badanie wpływu czynników: stężenie tlenu i rodzaj dodatku białkowego oraz ich interakcji, na całkowitą liczbę komórek (A), liczbę komórek CDX2 (B), liczbę komórek (SOX2) oraz liczbę komórek SOX17 (D), za pomocą dwuczynnikowej analizy wariancji (ANOVA). Na wykresach pokazana jest interakcja między czynnikami. df - liczba stopni swobody, F - wartość statystyki F-Snedecora, PR(>F) - p-wartość.

Zastosowanie 5% stężenia O₂ w hodowli *in vitro* zarodków królika, zwiększa zarówno ogólną liczbę komórek, jak i liczbę komórek poszczególnych linii komórkowych. Obserwacja ta jest prawdziwa w grupie kontrolnej oraz dla dodatków BSA i FBS, lecz nie dla KSR. W hodowlach z dodatkiem KSR uzyskiwano zarodki ze średnio mniejszą liczbą komórek przy zastosowaniu 5% stężenia O₂ niż przy zastosowaniu ~21% stężenia O₂. Ponadto zastosowanie KSR zwiększało odsetek komórek CDX2+ względem grupy kontrolnej a procent ten był większy w hodowli z atmosferycznym stężeniem tlenu niż w hodowli z 5% stężeniem tlenu.

Analiza filmów poklatkowych umożliwiła określenie czasu rozpoczęcia następujących stadiów: 2-komórkowego (2-kom.), 4-komórkowego (4-kom.), kompaktacji, moruli, kawitacji oraz (jeśli zachodzi) wykluwania się blastocysty z osłonek (Rycina 4). Kompaktacją określono stadium, w którym po raz pierwszy blastomery zarodka zaczynają do siebie ściślej przylegać i zacierają się granice między nimi. Morulą określono stadium, w którym komórki zarodka przylegają do siebie tak ściśle, że całkowicie zacierają się widoczne dla oka granice przylegania. W monitorowanych zarodkach, powyżej stadium 4-



Rycina 4. Przykładowe zdjęcia zarodków królika rozwijających się in vitro w systemie PrimoVision na poszczególnych stadiach rozwoju. Stadia te były brane pod uwagę w analizie morfokinetycznej.

komórkowego, nie udało się policzyć dokładnej liczby blastomerów. Blastomery w zarodkach króliczych dzielą się szybko, a maksymalna częstotliwość wykonywania zdjęć w systemie PrimoVision (co 10 minut) w wielu przypadkach nie pozwalała na ustalenie dokładnego początku stadium 8-komórkowego czy 16-komórkowego. W związku z tym, stadia te nie zostały uwzględnione na wykresach.

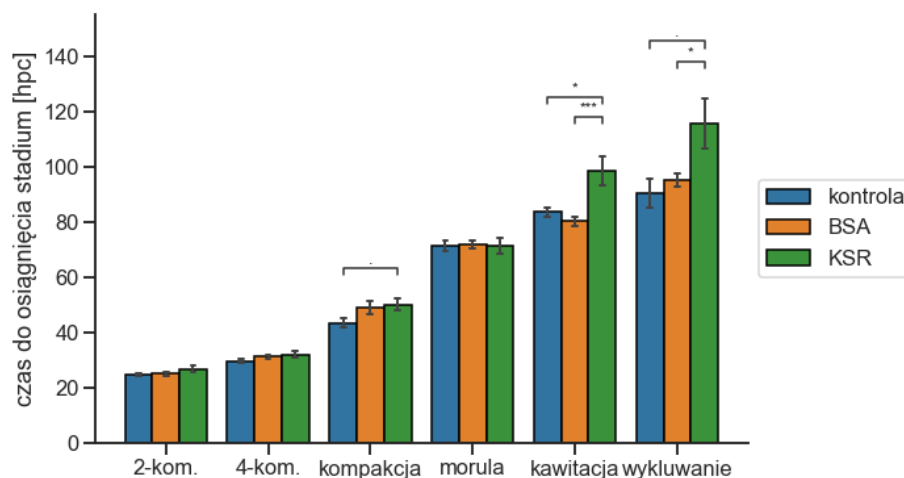
Średni czas osiągnięcia poszczególnych stadiów rozwojowych dla wszystkich grup doświadczalnych i kontrolnych przedstawiono w Tabeli 6.

Tabela 6 Średni czas (w godzinach po kryciu, hpc) rozpoczęcia poszczególnych stadiów rozwoju dla zarodków króliczych hodowanych in vitro w 5% lub ~21% stężeniu tlenu, w pożywce RDH z dodatkami białkowymi: BSA lub KSR oraz w pożywce bez dodatku białkowego (kontrola)

		2-kom.		4-kom.		kompaktacja		morula		kawitacja		wyklucie	
stężenie tlenu	dodatek białkowy	Średnia (hpc)	SE	Średnia (hpc)	SE	Średnia (hpc)	SE	Średnia (hpc)	SE	Średnia (hpc)	SE	Średnia (hpc)	SE
5%	BSA	25,0	0,9	31,2	1,0	48,8	2,4	71,8	1,4	80,3	1,6	95,3	2,5
	KSR	26,7	1,2	32,1	1,2	50,2	2,4	71,5	3,0	98,7	5,0	115,7	9,9
	kontrola	24,7	0,6	29,7	0,8	43,5a	1,8	71,4	1,9	83,6	2,0	90,6	5,2
21%	BSA	28,2	0,7	34,6	1,2	52,8	2,3	75,0	0,9	81,6	1,0	103,0	4,7
	KSR	29,8	0,9	35,0	0,8	53,0	1,3	77,8	2,9	97,0	3,7	124,3	4,4
	kontrola	23,8	0,4	28,5	1,0	41,5	1,1	75,8	1,8	85,6	2,0	100,7	2,6

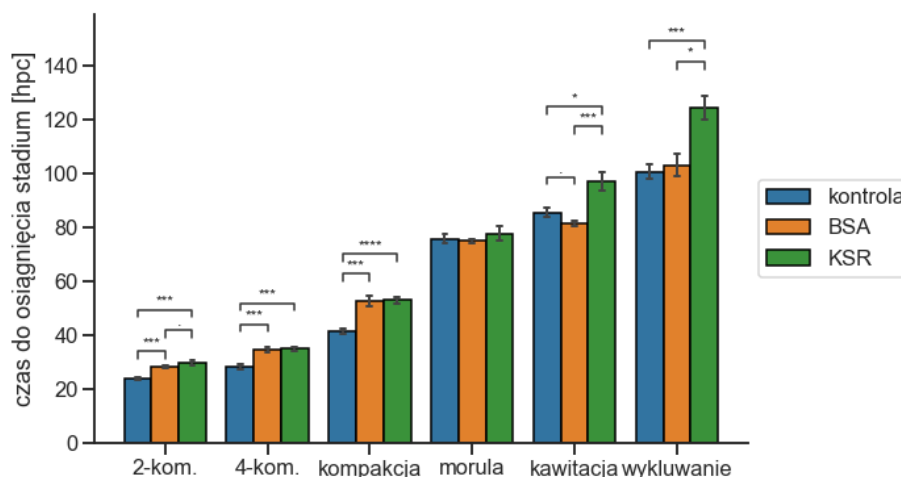
Analiza morfokinetyki zarodków hodowanych w 5% stężeniu O₂ wskazuje, że na etapie bruzdkowania (od zygoty do stadium moruli) zarodki osiągają poszczególne stadia rozwoju w podobnym czasie niezależnie od użytego dodatku białkowego (Tabela 8, Wykres 6). Zauważono również, że średni czas do osiągnięcia przez zarodki królicze stadium moruli wynosi 71 hpc i jest niemal jednakowy w grupach doświadczalnych: BSA (71 hpc, SE=1) i KSR (71 hpc, SE=3) oraz grupie kontrolnej (71 hpc, SE=1). W grupie doświadczalnej, gdzie dodatkiem białkowym był KSR, czas do rozpoczęcia kawitacji był znacząco dłuższy w porównaniu z BSA (p<0,005) i granicznie dłuższy w porównaniu z

kontrolą ($p < 0,05$). Wykluwanie się zarodków hodowanych z dodatkiem KRS, również następowało później niż w grupie kontrolnej i BSA



Wykres 6 Analiza filmów poklatkowych z rozwoju przedimplantacyjnych zarodków królika w warunkach tlenu 5% dla grup doświadczalnych BSA (kolor pomarańczowy) i KSR (kolor zielony) oraz grupy kontrolnej (kolor niebieski). Na osi y oznaczono czas po kryciu (hpc), na osi x kolejne stadia rozwojowe. P-wartość **** – $p < 0,001$; *** – $p < 0,005$; ** – $p < 0,01$; * – $p < 0,05$; . – $p < 0,1$ (test Kruskala–Wallisa)

Analiza morfokinetyki zarodków hodowanych w **~21% stężeniu O_2 na etapie bruzdkowania** wskazuje na istotne różnice w tempie osiągania poszczególnych stadiów rozwojowych, w zależności od użytego dodatku białkowego, w porównaniu z kontrolą (Tabela 8, Wykres 7). Zarodki królika, w pożywce bez dodatku białkowego istotnie szybciej osiągają stadium 2-komórkowe, 4-komórkowe oraz zaczynają kompaktację niż zarodki w grupach doświadczalnych BSA i KRS ($p < 0,005$).



Wykres 7 Analiza filmów poklatkowych z rozwoju przedimplantacyjnych zarodków królika w warunkach tlenu atmosferycznego dla grup doświadczalnych BSA (kolor pomarańczowy) i KSR (kolor zielony) oraz grupy kontrolnej (kolor niebieski). Na osi y oznaczono czas po kryciu (hpc), na osi x kolejne stadia rozwojowe. p-wartość **** – $p < 0,001$; *** – $p < 0,005$; ** – $p < 0,01$; * – $p < 0,05$; . – $p < 0,1$ (test Kruskala–Wallisa)

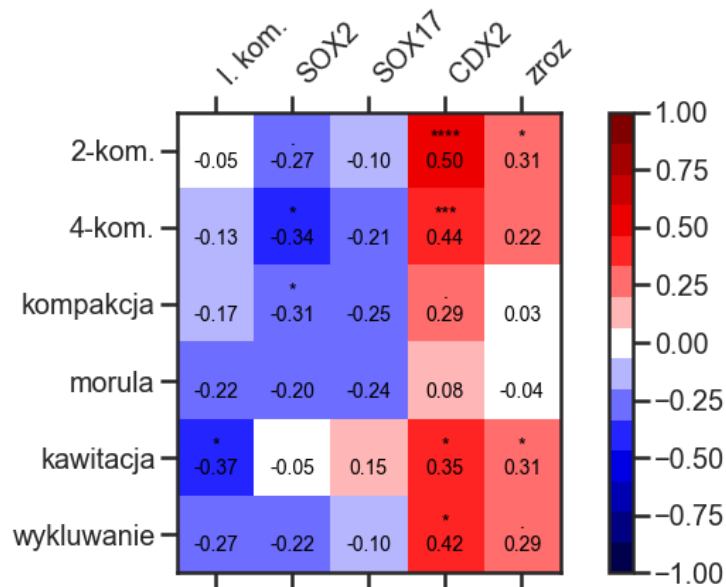
Pomimo istotnych różnic w tempie osiągnięcia poszczególnych stadiów na etapie bruzdkowania zauważono, że podobnie jak w przypadku hodowli w 5% stężeniu O_2 zarodki królicze osiągają stadium moruli w podobnym czasie – średnio 75 hpc, niezależnie od użytego dodatku białkowego (grupa BSA: 75 hpc, SE=0,8; grupa KSR: 77 hpc, SE=2, grupa kontrolna 75 hpc, SE=1). W grupie kontrolnej czas, w którym dochodzi do kawitacji i wykluwania się wydaje się być krótszy w porównaniu z grupą doświadczalną KSR (kawitacja: $p<0,05$; wykluwanie: $p<0,005$). Widoczne są również różnice między czasem kawitacji i wykluwania między grupami BSA i KSR. W grupie BSA zarodki rozpoczynają kawitację istotnie szybciej niż zarodki z grupy KSR ($p<0,005$) oraz wydaje się, że wykluwanie grupie BSA zachodzi szybciej niż w grupie KSR ($p<0,05$).

W celu sprawdzenia czy istnieje zależność monotoniczna między obecnością markerów pierwszych linii komórkowych a czasem osiągnięcia przez zarodki kolejnych stadiów rozwojowych, wszystkie zarodki analizowane za pomocą systemu PrimoVision, potraktowano jako jedną grupę badawczą, nie biorąc pod uwagę warunków tlenowych i dodatku białkowego i wyznaczono macierz korelacji metodą Spearmana (Wykres 11). Wartości dodatnie oznaczają pozytywną korelację między czasem osiągnięcia danego stadium a liczbą komórek w zarodku (im więcej czasu zajęło osiągnięcie danego stadium, tym więcej było komórek danego rodzaju); wartości ujemne – negatywną korelację (im mniej czasu zajęło osiągnięcie danego stadium tym więcej było komórek danego rodzaju). Wartości bezwzględne bliskie 1 (tj. -1 i 1) oznaczają silną liniową zależność między parą zmiennych; wartości bliskie 0 wskazują na brak liniowej zależności między zmiennymi.

Na Wykresie 12 pokazano, że całkowita liczba komórek oraz liczba komórek SOX2+ i SOX17+ jest negatywnie skorelowane z czasami osiągnięcia wszystkich stadiów rozwojowych (oprócz kawitacja vs SOX17), zaś liczba komórek CDX2+ i łączna liczba zróżnicowanych komórek w zarodku – skorelowane pozytywnie. Oznacza to, że zarodki, które rozwijają się szybciej, mają zwykle więcej komórek oraz więcej komórek SOX2+ i SOX17+, zaś te, które rozwijają się wolniej – więcej komórek CDX2+.

W szczególności, całkowita liczba komórek jest negatywnie skorelowana ($\rho=-.37$) z czasem kawitacji, zatem im szybciej to stadium było osiągnięte, tym więcej komórek w 6 dniu hodowli liczył dany zarodek. Analogicznie liczba komórek SOX2+ była negatywnie skorelowana ($\rho=-.34$) z czasem osiągnięcia stadium 4-komórkowego. Liczba komórek SOX17+ nie wykazywała wyraźnych korelacji z obserwowanymi czasami rozpoczęcia poszczególnych stadiów. Odwrotnie niż całkowita liczba komórek, oraz liczba SOX2+ i SOX17+, liczba komórek CDX2+ była pozytywnie skorelowana z czasem osiągnięcia stadium 2-komórkowego ($\rho=0.50$), z czasem kawitacji ($\rho=0.35$) i czasem wykluwania ($\rho=0.42$). Oznacza to, że im więcej czasu zajęło osiągnięcie tych stadiów, tym więcej komórek CDX2+ było obserwowanych w zarodku. Podobnie, łączna liczba zróżnicowanych komórek w zarodkach (zroz)

była pozytywnie skorelowana z czasem osiągnięcia stadium 2-komórkowego ($\rho=0.31$) oraz kawitacji ($\rho=0.31$). Co ciekawe, łączna liczba zróżnicowanych komórek była niezależna od czasu osiągnięcia kompaktacji ($\rho=0.03$) i stadium moruli ($\rho=-0.04$), ale w zależności od tego czasu, zmieniały się proporcje zróżnicowanych komórek. Zarodki, które szybko osiągały te stadia miały (średnio) więcej komórek ogółem oraz SOX2+ i SOX17+; te zaś, które osiągały te stadium stosunkowo wolno – więcej komórek CDX2+.



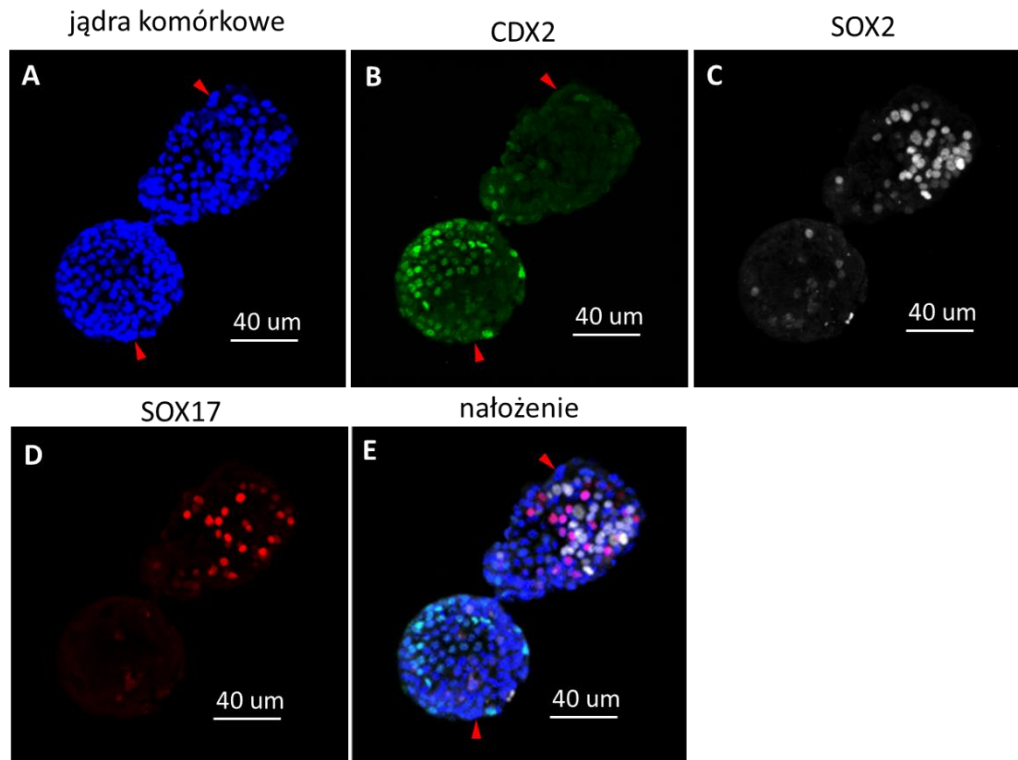
Wykres 8. Macierz korelacji Spearmana pomiędzy czasami osiągnięcia poszczególnych stadiów (oś pionowa) i liczbą komórek (DAPI), bądź komórek zróżnicowanych na poszczególne linie komórkowe: TE-CDX2, EPI-SOX2, PrE-SOX17 oraz wszystkich zróżnicowanych komórek w zarodku (zroz=SOX2+SOX17+CDX2). Kolorem oznaczono wartość korelacji Spearmana między parą "czas dojścia do stadium"- "liczba komórek".

Zarodki, które osiągały poszczególne stadia rozwojowe w krótszym czasie, mają zwykle większą całkowitą liczbę komórek oraz więcej komórek SOX2+ i SOX17+, zaś te, które rozwijają się wolniej – więcej komórek CDX2+.

W rozwijających się *in vivo* zarodkach króliczych w stadium E6.0 obserwowano obecność markerów wszystkich trzech linii komórkowych we wszystkich komórkach budujących zarodek (Rycina 2, F). *In vivo* stadium E6.0 charakteryzuje się obecnością warstwy komórek endodermy pierwotnej (PrE) pod warstwą komórek trofektodermy (TE). Epiblast znajdujący się na jednym z biegunów blastocysty, tworzy zwarta grupa komórek SOX2+ (Rycina 2, F) z zewnątrz otoczona warstwą TE a od strony jamy blastocysty komórkami PrE.

W zarodkach króliczych z hodowli *in vitro* 6 *dpc* wzór różnicowania przypominający ten w zarodkach *in vivo* nie występuje. Niezależnie od zastosowanego w hodowli stężenia tlenu czy rodzaju dodatku białkowego w zarodkach króliczych hodowanych do stadium 6 *dpc* obserwowano znaczny udział komórek (od 35% do 83%) niewykazujących obecności markerów charakterystycznych dla pierwszych linii komórkowych (Wykres 4, Rycina 5). Jest to widoczne szczególnie w komórkach

trofektodermi, gdzie znaczna część komórek wykazuje brak markera CDX2 (Rycina 5, A, B, C, czerwony grot). Ponadto komórki epiblastu i endodermy pierwotnej są ze sobą przemieszane i nie obserwujemy warstwy komórek PrE pod warstwą TE. Dodatkowo w zarodkach króliczych hodowanych *in vitro*, które się wykluwają, wyklucie jest zawsze częściowe, co oznacza, że zarodek przybiera kształt cyfry 8 (Rycina 5). W częściowo wyklutej blastocystie często nie jest możliwe wyodrębnienie struktury węzła zarodkowego. W przykładowym zarodku z Ryciny 5, obserwujemy komórki SOX2+ w obu częściach zarodka (Rycina 5, C), natomiast komórki SOX17 tylko w jednej części zarodka (Rycina 5, D).



Rycina 5. Różnicowanie pierwszych linii komórkowych w przykładowym zarodku króliczym w stadium 6 dpc rozwijającym się w hodowli *in vitro*. Użyte markery linii komórkowych: TE-CDX2 (B), EPI-SOX2 (C), PrE-SOX17 (D), jądra komórkowe-barwnik Hoechst (A). Występujące w zarodkach 6 dpc komórki TE bez markera CDX2 zaznaczono czerwonym grotami.

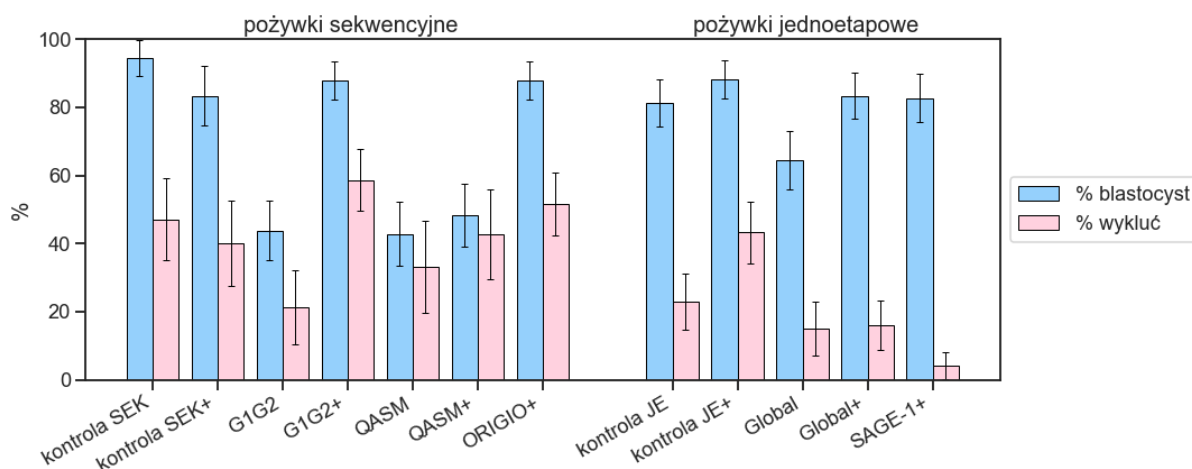
W zarodkach króliczych hodowanych *in vitro* do stadium 6 dpc, w przeciwieństwie do zarodków E6.0 *in vivo*, znaczna liczba komórek nie wykazywała obecności markerów pierwszych linii komórkowych. Obecność komórek niezróżnicowanych, obserwowano w zarodkach hodowanych *in vitro* w każdym z wariantów doświadczenia, niezależnie od użytych dodatków białkowych czy stężenia tlenu.

6.4 Hodowla zarodków króliczych w komercyjnych pożywkach w systemie: sekwencyjnym lub jednoetapowym

Pożywki komercyjne wykorzystywane głównie w klinikach *in vitro* do hodowli zarodków ludzkich, według producentów zawierają w swoim składzie substancje umożliwiające prawidłowy rozwój zarodka ludzkiego od zygoty do blastocysty. W tej części doświadczeń analizowano wpływ

komercyjnych pożywek na rozwój i powstawanie pierwszych linii komórkowych w zarodkach królika. W doświadczeniach użyto pożywek dedykowanych do dwóch systemów hodowli: sekwencyjnego i jednoetapowego. W celu zbadania wpływu komponentu białkowego, zarodki hodowano w dwóch wariantach: z dodatkiem komponentu białkowego: HSA lub BSA, oznaczone na wykresach jako „+” lub bez dodatku białkowego. Grupą kontrolną dla doświadczeń z użyciem pożywek sekwencyjnych (kontrola SEK/kontrola SEK+), była hodowla zarodków z odnowieniem pożywki RDH/RDH+.

Hodowla zarodków króliczych w pożywkach sekwencyjnych, bez dodatku białkowego: G-1™/G-2™ (Wykres 9 – G1G2) oraz Quinn’s Advantage™ Cleavage Medium/Quinn’s Advantage™ Blastocyst Medium (Wykres 9 – QASM), wykazała najmniejszy odsetek uzyskanych blastocyst i wyklutych zarodków, w porównaniu z pożywką kontrolną bez dodatku białkowego, jak i w porównaniu z pożywką o takim samym składzie z dodatkiem białkowym (Wykres 9 – G1G2+, QASM+). W przypadku hodowli w pożywce G1G2 uzyskano rozwój 43% zarodków do stadium blastocysty oraz 21% wykluwających się zarodków. W przypadku hodowli w pożywce QASM uzyskano rozwój 44% zarodków do stadium blastocysty oraz 33% wykluwających się zarodków. W pożywce kontrolnej bez dodatku białkowego (Wykres 9 – kontrola SEK), uzyskano rozwój 94% zarodków do stadium blastocysty oraz 47% wykluwających się zarodków.



Wykres 9. Procent zarodków króliczych, które w hodowli w poszczególnych pożywkach sekwencyjnych i jednoetapowych, osiągnęły stadium blastocysty (kolor niebieski) oraz procent blastocyst, które w hodowli zaczęły się wykluwać z osłonek (kolor różowy). Dla pożywek sekwencyjnych kontrolą była hodowla zarodków w pożywce RDH z odnowieniem pożywki po osiągnięciu przez zarodki stadium kompaktacji tj. 48 hpc. Dla pożywek jednoetapowych kontrolą była hodowla ciąża w pożywce RDH. „+” oznacza pożywkę suplementowaną komponentem białkowym: BSA (kontrola+, QASM+, Global+) lub HSA (G1G2+, ORIGIO+, SAGE-1+). Słupki niepewności oznaczają 68% przedział ufności dla odsetka obliczony metodą Wilsona.

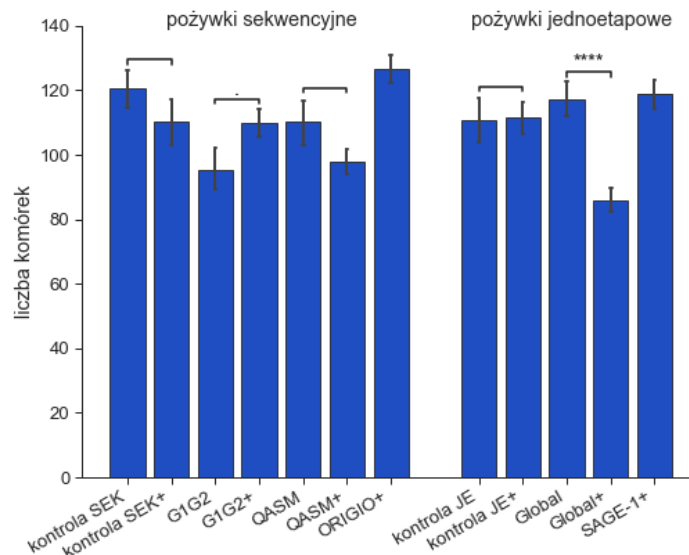
Pożywki komercyjne, umożliwiające hodowlę zarodków w systemie jednoetapowym, użyte w doświadczeniach to: Global® (Wykres 9 – Global) oraz pożywka SAGE-1 step (Wykres 9 – SAGE-1+). Pożywka Global® używano w dwóch wariantach: suplementowaną dodatkiem białkowym 0,3% BSA (Wykres 9 – Global+) lub bez suplementu białkowego (Wykres 9 – Global). Pożywkę SAGE-1 producent suplementuje HSA. Hodowla w pożywce Global, bez suplementu białkowego wykazała mniejszy procent zarodków osiągających stadium blastocysty w porównaniu z pożywką kontrolną (Wykres 9 –

kontrola JE) oraz pożywką o tym samym składzie suplementowaną dodatkiem białkowym (Global+). W pożywce Global, 64% zarodków osiągnęło stadium blastocysty w tym 15% wykluwało się. W pożywce kontrolnej (kontrola JE) 81% zarodków osiągnęło stadium blastocysty w tym 23% wykluwało się. W pożywce Global+ 83% zarodków króliczych osiąga stadium blastocysty w tym 16% wykluwa się. W pożywce SAGE-1+ 82% hodowanych zarodków osiągnęło stadium blastocysty w tym 4% wykluło się. W pożywce jednoetapowej kontrolnej (Wykres 9 – kontrola JE+) 88% zarodków osiągnęło stadium blastocysty, w tym 43% wykluło się.

Powyższe wyniki wskazują, że suplementacja pożywek sekwencyjnych z dodatkiem białkowym HSA (G1G2+ i ORIGIO+) wpływa na zwiększenie liczby zarodków osiągających stadium blastocysty oraz liczby wyklutych blastocyst. W pożywkach jednoetapowych (Global) i sekwencyjnych (G1G2 i QASM) niesuplementowanych dodatkami białkowymi najmniej zarodków osiągało stadium blastocysty. Zauważono także, że w komercyjnych pożywkach jednoetapowych (Global, Global+, SAGE-1) wykluwa się znacznie mniej zarodków niż w pożywce kontrolnej (kontrola JE/JE+) oraz w pożywkach sekwencyjnych.

Zarodki hodowane w systemach sekwencyjnym i jednoetapowym, które osiągnęły stadium blastocysty 5 *dpc*, zostały zanalizowane pod kątem całkowitej liczby komórek (Wykres 10) oraz liczby komórek wykazujących obecność białek charakterystycznych dla pierwszych linii komórkowych: CDX2 – TE (Wykres 11), SOX2 – EPI (Wykres 12), SOX17 – PrE (Wykres 13). Grupy kontrolne dla zarodków hodowanych w pożywkach sekwencyjnych stanowiły zarodki hodowane w pożywce RDH suplementowanej 0,3% BSA (kontrola SEK+) lub bez dodatku białkowego (kontrola SEK) z odnowieniem pożywki. Odnowienie pożywki, to znaczy przeniesienie zarodków do świeżej kropli pożywki RDH, następowało po 48 *hpc*, czyli w tym samym czasie kiedy przenoszono zarodki z jednej pożywki sekwencyjnej do drugiej. Dzięki temu zarodki w grupach kontrolnych, podobnie jak zarodki z grup doświadczalnych narażone były przy wyjęciu z inkubatora na chwilowe zmiany warunków fizykochemicznych otoczenia (temperatury, pH, stężenia CO₂) oraz na wpływ światła. Grupy kontrolne dla zarodków hodowanych w pożywkach jednoetapowych stanowiły zarodki hodowane w pożywce RDH z 0,3% BSA (kontrola JE+) lub bez dodatku białkowego (kontrola SEK). Blastocysty 5 *dpc* uzyskane w hodowli *in vitro* w systemie sekwencyjnym bez dodatków białkowych osiągały średnio 120 komórek w grupie kontrolnej, 95 komórek w grupie G1G2 i 110 komórek w grupie QASM (Wykres 10).. W hodowli w pożywkach sekwencyjnych z dodatkiem białkowym blastocysty osiągały średnio 110 komórek w grupie kontrola SEK+, 110 komórek w grupie G1G2+, 98 komórek w grupie QASM+ oraz 126 komórek w grupie ORIGIO+ (Wykres 10). W przypadku pożywek sekwencyjnych nie obserwowano jednoznacznego, pozytywnego wpływu dodatku białkowego na liczbę komórek zarodka. W przypadku pożywki G1/G2 stwierdzono zwiększenia liczby komórek w wariancie pożywki z dodatkiem białkowym,

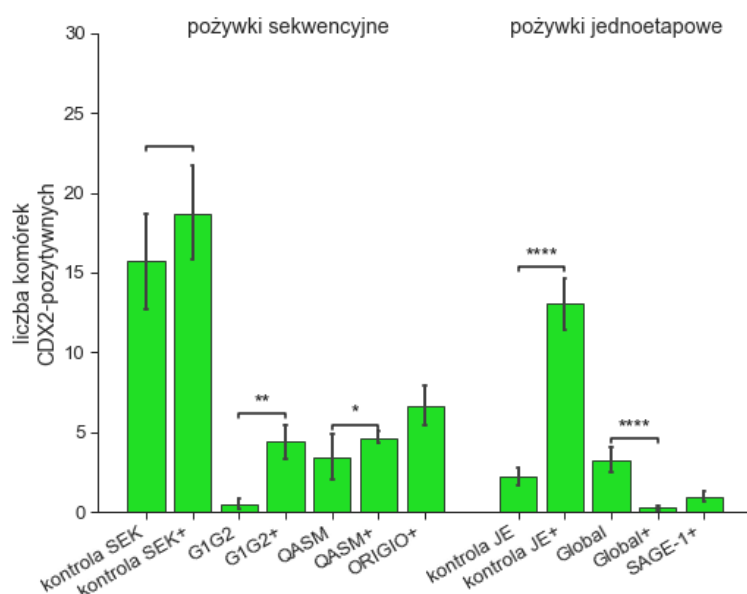
jednak wynik nie jest istotny statystycznie ($p < 0,1$) (Wykres 10). W pożywce QASM oraz kontroli zaobserwowano zmniejszenie liczby komórek zarodka w wariacie z dodatkiem białkowym, jednak wynik ten również nie jest istotny statystycznie (Wykres 10). Blastocysty 5 *dpc* otrzymane w hodowli w systemie jednoetapowym bez dodatków białkowych osiągały średnio 110 komórek w grupie kontrolnej oraz 91 komórek w grupie Global. W grupach z dodatkiem białkowym, blastocysty osiągały



Wykres 10. Średnia liczba komórek w zarodkach hodowanych w dwóch typach systemów hodowli: sekwencyjnym i jednoetapowym. Dla pożywek sekwencyjnych kontrolą była hodowla zarodków w pożywce RDH z odnowieniem pożywki po osiągnięciu przez zarodki stadium kompaktacji tj. 48 hpc. Dla pożywek jednoetapowych kontrolą była hodowla ciągła w pożywce RDH. „+” oznacza pożywkę suplementowaną komponentem białkowym: BSA (kontrola SEK+, kontrola JE+ QASM+, Global+) lub HSA (G1G2+, ORIGIO+, SAGE-1+). p-value: **** - $p < 0,001$; *** - $p < 0,005$; ** - $p < 0,01$; * - $p < 0,05$; . - $p < 0,1$ (test Kruskala-Wallis)

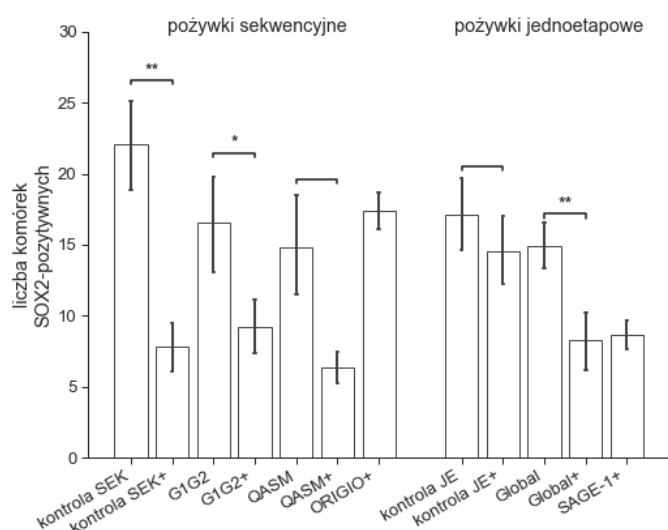
średnio 111 komórek w grupie kontrola JE+, 85 komórek w grupie Global+ oraz 118 w grupie SAGE-1+ (Wykres 10). W grupie Global, dodatek białkowy istotnie wpłynął na zmniejszenie się liczby komórek w zarodku ($p < 0,001$) (Wykres 10).

Analiza zarodków hodowanych w pożywkach sekwencyjnych wykazała, że w przypadku markera trofektodermy – CDX2, największa liczba komórek CDX2+ występuje w zarodkach z grupy kontrolnej z dodatkiem białkowym (18, SE=3) (Wykres 11). W przypadku wszystkich badanych pożywek komercyjnych sekwencyjnych najwięcej komórek CDX2+ wykazują zarodki hodowane w pożywce sekwencyjnej ORIGIO+(6, SE=1). Zauważono także, że zarodki hodowane w pożywkach komercyjnych w systemie sekwencyjnym z dodatkiem białkowym posiadały istotnie więcej komórek CDX2+ niż w wariantach bez dodatku białkowego (dla G1G2: $p < 0,01$; dla QASM: $p < 0,05$) (Wykres 11).



Wykres 12. Średnia liczba komórek CDX2 w zarodkach hodowanych w dwóch typach systemów hodowli: sekwencyjnymi i jednoetapowym. Dla pożywek sekwencyjnych kontrolą była hodowla zarodków w pożywce RDH z odnowieniem pożywki po osiągnięciu przez zarodki stadium kompaktnej moruli – 48 hpc. Dla pożywek jednoetapowych kontrolą była hodowla ciągła w pożywce RDH. „+” oznacza pożywkę suplementowaną komponentem białkowym: BSA (kontrola SEK+, kontrola JE+, QASM+, Global+) lub HSA (G1G2+, ORIGIO+, SAGE-1+). p-wartość: **** - $p < 0,001$; *** - $p < 0,005$; ** - $p < 0,01$; * - $p < 0,05$; . - $p < 0,1$ (test Kruskala-Wallis).

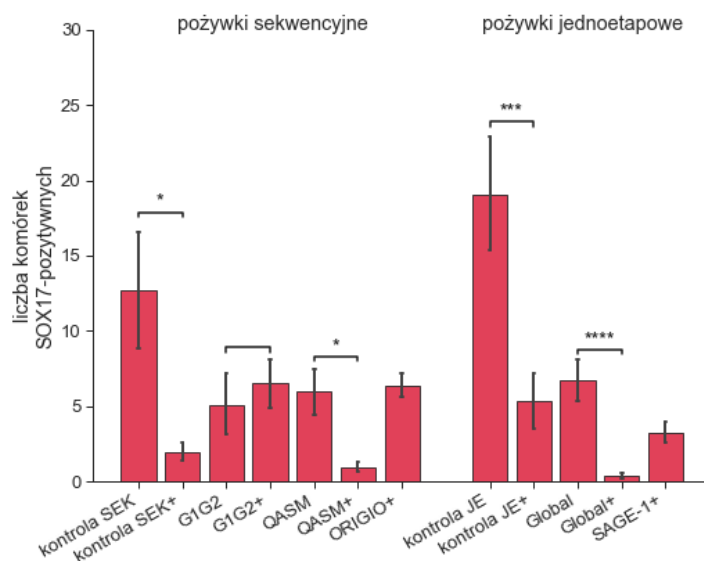
W grupie pożywek jednoetapowych największą liczbę komórek CDX2+ stwierdzono w zarodkach z grupy kontrolnej z dodatkiem białkowym (13, SE=1). Zauważono także, że w grupie kontrolnej dodatek białkowy istotnie zwiększył liczbę komórek CDX2+, w porównaniu z hodowlą bez dodatku ($p < 0,001$). Hodowla w pożywce Global dała efekt odwrotny. Suplementacja pożywki Global dodatkiem białkowym istotnie wpłynęła na zmniejszenie liczby komórek CDX2+ w hodowanych zarodkach ($p < 0,001$) (Wykres 11).



Wykres 11. Średnia liczba komórek SOX2 w zarodkach hodowanych w dwóch typach systemów hodowli: sekwencyjnym i jednoetapowym. Dla pożywek sekwencyjnych kontrolą była hodowla zarodków w pożywce RDH z odnowieniem pożywki po osiągnięciu przez zarodki stadium kompaktacji tj. 48 hpc (kontrola SEK). Dla pożywek jednoetapowych kontrolą była hodowla ciągła w pożywce RDH (kontrola JE). „+” oznacza pożywkę suplementowaną komponentem białkowym: BSA (kontrola SEK+, kontrola JE+, QASM+, Global+) lub HSA (G1G2+, ORIGIO+, SAGE-1+). p-wartość: **** - $p < 0,001$; *** - $p < 0,005$; ** - $p < 0,01$; * - $p < 0,05$; . - $p < 0,1$ (test Kruskala-Wallis).

Analizując zróżnicowanie zarodków w kierunku linii epiblastu wykazano, że w pożywkach sekwencyjnych najwięcej komórek SOX2+ było w zarodkach hodowanych w pożywce kontrolnej bez dodatku białkowego (22, SE=3) (Wykres 12). Biorąc pod uwagę jedynie pożywki komercyjne sekwencyjne, największą liczbę komórek SOX2+ uzyskano w hodowli w pożywce ORIGIO+ (17, SE=1) (Wykres 12). Ponadto zarodki hodowane do stadium 5 *dpc* w pożywkach sekwencyjnych bez dodatków białkowych mają większą liczbę komórek epiblastu niż zarodki hodowane w wariantach tych samych pożywek sekwencyjnych z dodatkiem białkowym. W przypadku grupy kontrolnej SEK oraz G1G2 wynik ten jest istotny statystycznie (dla kontroli: $p < 0,01$; dla G1G2: $p < 0,05$).

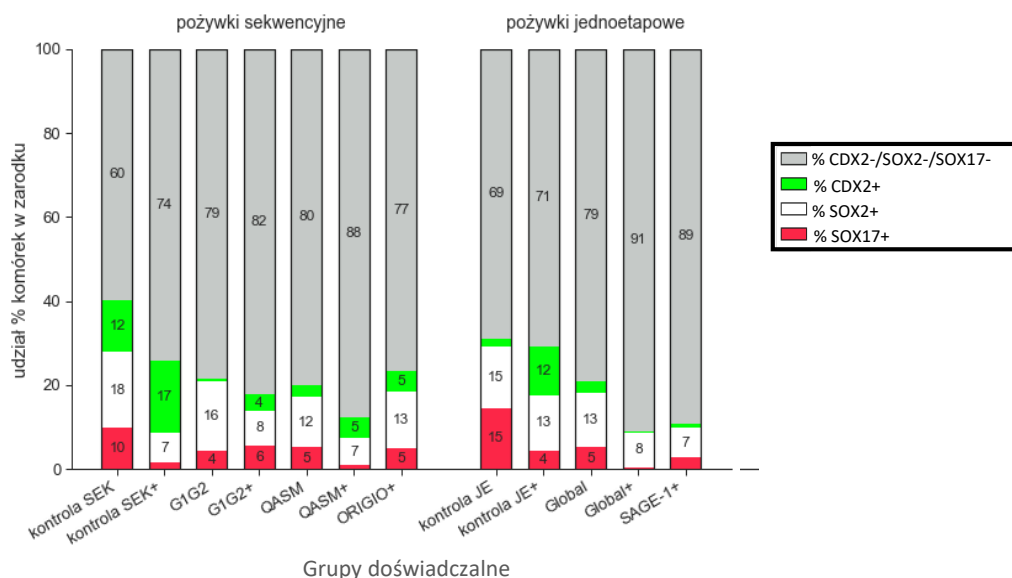
W pożywkach jednoetapowych największą liczbę komórek epiblastu uzyskano hodując zarodki w pożywce kontrolnej bez dodatku białkowego (17, SE=2) a biorąc pod uwagę jedynie pożywki komercyjne jednoetapowe najwięcej komórek SOX2+ uzyskano hodując zarodki w pożywce Global bez dodatku białkowego (15, SE=1) (Wykres 12). Zauważono także, że dodanie do pożywki Global dodatku białkowego istotnie zmniejsza liczbę komórek SOX2+ w porównaniu z tą samą pożywką bez dodatku ($p < 0,01$).



Wykres 13. Średnia liczba komórek SOX17 w zarodkach hodowanych w dwóch typach systemów hodowli: sekwencyjnym i jednoetapowym. Dla pożywek sekwencyjnych kontrolą była hodowla zarodków w pożywce RDH z odnowieniem pożywki po osiągnięciu przez zarodki stadium kompaktacji tj. 48 hpc. Dla pożywek jednoetapowych kontrolą była hodowla ciągła w pożywce RDH. „+” oznacza pożywkę suplementowaną komponentem białkowym: BSA (kontrola+, QASM+, Global+) lub HSA (G1G2+, ORIGIO+, SAGE-1+). p-wartość: **** - $p < 0,001$; *** - $p < 0,005$; ** - $p < 0,01$; * - $p < 0,05$; . - $p < 0,1$ (test Kruskala-Wallis).

Analizując różnicowanie komórek zarodka w kierunku endodermy pierwotnej wykazano, że w grupie pożywek sekwencyjnych najwięcej komórek SOX17+ uzyskano w pożywce kontrolnej bez dodatku białkowego – kontrola SEK (12, SE=3). Biorąc pod uwagę jedynie pożywki, komercyjne sekwencyjne, największą liczbę komórek SOX17+ uzyskano hodując zarodki w pożywce G1G2+ (6, SE=1) (Wykres 13). Ponadto stwierdzono istotnie mniej komórek SOX17+ w wariacie pożywki z dodatkiem białkowym w porównaniu z pożywką bez dodatku białkowego (kontrola i QASM: $p < 0,01$).

Zarodki hodowane w pożywkach jednoetapowych, posiadały największą liczbę komórek endodermy pierwotnej w pożywce kontrolnej bez dodatku białkowego (19 SE=3) a biorąc pod uwagę jedynie pożywki komercyjne jednoetapowe najwięcej komórek SOX17+ uzyskaliśmy w hodowli w pożywce Global bez dodatku białkowego (15, SE=1) (Wykres 13). Zauważono także, że w hodowla w pożywce kontrolnej oraz pożywce Global istotnie zmniejsza liczbę komórek PrE. Zarodki hodowane w komercyjnych pożywkach sekwencyjnych i jednoetapowych wykazywały większy udział komórek nieodróżnicowanych w stosunku do kontroli (w pożywkach sekwencyjnych G1G2 (79 vs. 60), G1G2+ (82 vs 74), QASM (80 vs.60), QASM+ (88 vs. 74) i ORIGIO+ (77 vs. 74); w pożywkach jednoetapowych: Global (79 vs. 69), Global+ (91 vs. 71), SAGE-1 (89 vs. 71)) (Wykres 14). Zauważono, że zarodki w stadium 5 *dpc* hodowane *in vitro* niezależnie od użytego systemu i pożywki wykazywały obecność komórek SOX2+, natomiast w niektórych z pożywek zarodki, mimo że morfologicznie osiągały w stadium blastocysty, nie wykazywały obecności komórek CDX2+ (pożywka G1G2, pożywka Global+) i/lub komórek SOX1+ (pożywka Global+, pożywka QASM+) (Wykres 14).



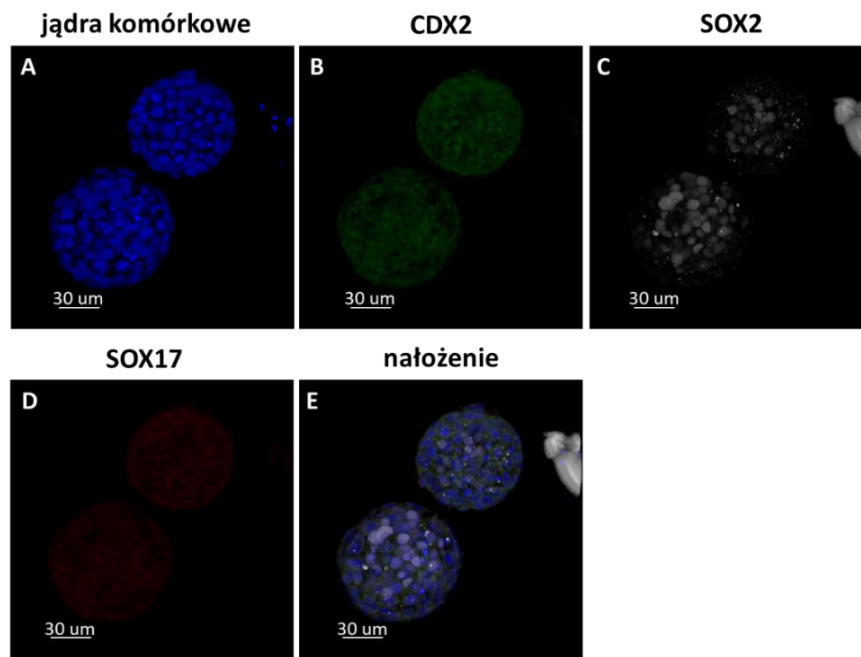
Wykres 14. Udział procentowy komórek nieodróżnicowanych (kolor szary) i zróżnicowanych na trzy pierwsze linie komórkowe: TE-CDX2 (kolor zielony), EPI-SOX2 (kolor biały), PrE-SOX17 (kolor czerwony) w zarodkach hodowanych w dwóch systemach hodowlanych: sekwencyjnym i jednoetapowym.

Hodowla zarodków królika zarówno w komercyjnych pożywkach sekwencyjnych, jak i jednoetapowych (z dodatkiem białkowym, jak i bez dodatku) nie zwiększa liczby komórek pierwszych linii komórkowych w porównaniu z hodowlą zarodków w pożywce kontrolnej RDH (kontrola JE/JE+) lub RDH z odnowieniem (kontrola SEK/SEK+). Hodowla zarodków króliczych w pożywce Global+ i G1G2 negatywnie wpływa na różnicowanie komórek TE. Natomiast hodowla w pożywce QASM+ i Global+ negatywnie wpływa na różnicowanie komórek PrE. Największą liczbę komórek zróżnicowanych na wszystkie trzy pierwsze linie komórkowe wykazywały zarodki hodowane w pożywce RDH bez dodatku białkowego z odnowieniem (kontrola SEK).

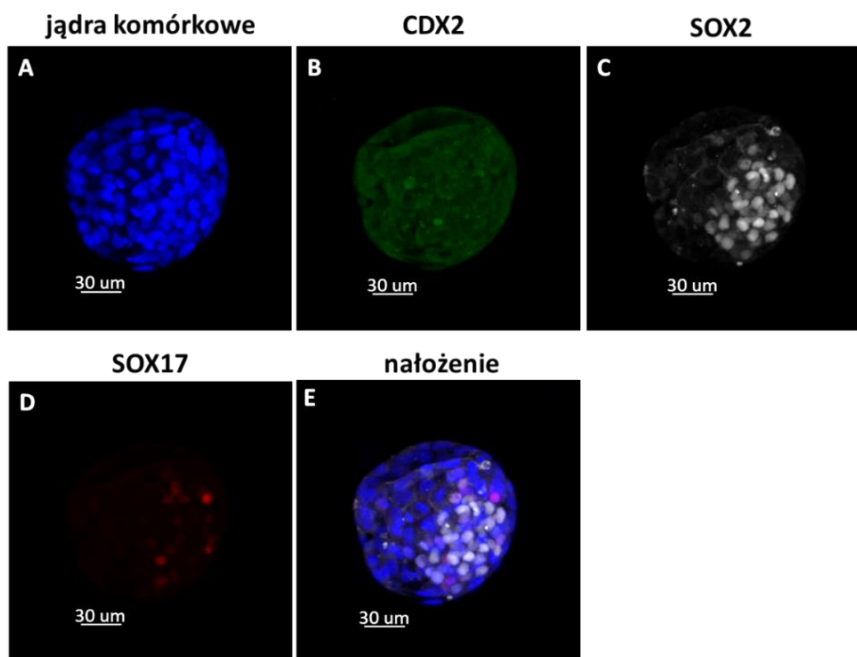
Zarodki królicze, w stadium blastocysty E5.0 rozwijające się *in vivo* zbudowane są z minimum 2048 komórek. W stadium E5.0, każda z komórek blastocysty wykazuje przynależność do linii komórkowej epiblastu, endodermy pierwotnej lub trofektodermy (Rycina 1 i 2). W zarodkach E5.0 komórki trofektodermy wykazują obecność czynnika transkrypcyjnego CDX2 i nie obserwujemy w warstwie TE, komórek niezróżnicowanych. W zarodkach E5.0 endoderma pierwotna tworzy warstwę komórek SOX17+h pod warstwą TE (Rycina 1 i 2, E), natomiast epiblast stanowi grupa komórek SOX2+, na jednym z biegunów blastocysty (Rycina 2, E).

W przypadku hodowli w zarodków królika do stadium blastocysty 5 *dpc* w pożywkach komercyjnych, zarówno sekwencyjnych, jak i jednoetapowych nie obserwujemy podobnego wzoru zróżnicowania co *in vivo*. Najmniej komórek zróżnicowanych uzyskano w hodowli w pożywce Global+. Zarodki królicze hodowane w pożywce Global+, mimo osiągnięcia stadium blastocysty, w znacznej większości nie wykazywały obecności markerów linii komórkowych: TE i PrE (Rycina 6, B, D). Jedynym markerem obecnym w zarodkach po hodowli w pożywce Global+ był SOX2 (Rycina 6, C).

W pożywkach sekwencyjnych G1G2+, QASM, ORIGIO+ oraz w pożywce jednoetapowej Global, zarodki królicze wykazywały obecność wszystkich trzech linii komórkowych, chociaż wciąż występują komórki niewykazujące obecności markerów TE, EPI i PrE (Rycina 7, B, C, D).



Rycina 6. Różnicowanie komórek w blastocystyce króliczej stadium 5 *dpc*, uzyskanych z hodowli w pożywce jednoetapowej Global+. Użyte markery linii komórkowych TE–CDX2 (B), EPI–SOX2 (C), PrE–SOX17 (D), jądra komórkowe – barwnik Hoechst (A)



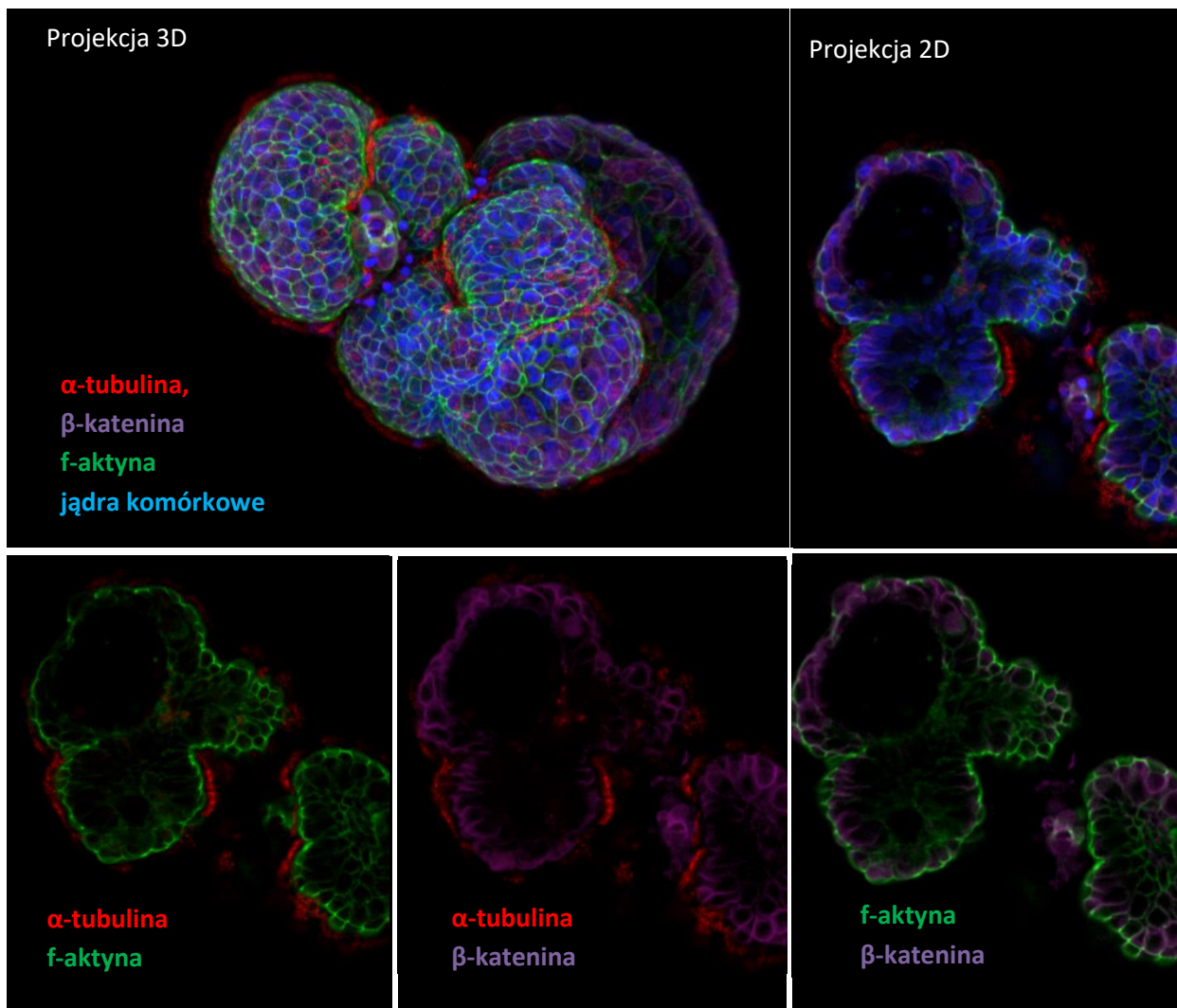
Rycina 7. Różnicowanie komórek w blastocystie króliczej stadium 5 dpc, uzyskanych z hodowli w pożywce sekwencyjnej ORIGIO+. Użyte markery linii komórkowych TE-CDX2 (B), EPI-SOX2 (C), PrE-SOX17 (D), jądra komórkowe – barwnik Hoechst (A).

6.5 Współhodowla przedimplantacyjnych zarodków króliczych z pęcherzykami z króliczych komórek nabłonkowych jajowodu (ROEC)

Współhodowla zarodków ssaków z komórkami somatycznymi jest jedną ze stosowanych obecnie technik mających poprawić jakość zarodków w hodowli *in vitro*. Zastosowanie współhodowli, teoretycznie ma przybliżyć warunki rozwoju, z którymi zarodek styka się w rozwoju *in vivo*, ponieważ komórki somatyczne parakrynnie wydzielają do pożywki hodowlanej czynniki wzrostu i substancje odżywcze. Rozwój przedimplantacyjnych zarodków królika z zastosowaniem technik współhodowli był wcześniej badany jednak uzyskane wyniki nie pozwalają na jednoznaczne potwierdzenie korzyści płynących z zastosowania współhodowli^{10,11}

Fragmenty tkanek jajowodu królika, w pożywce kontrolnej RDH, zachowywały żywotność, a ze względu na ciągły ruch rzęsek komórek urzęsionych ROEC, pęcherzyki stale przemieszczały się w kropli pożywki, poruszając również zarodki.

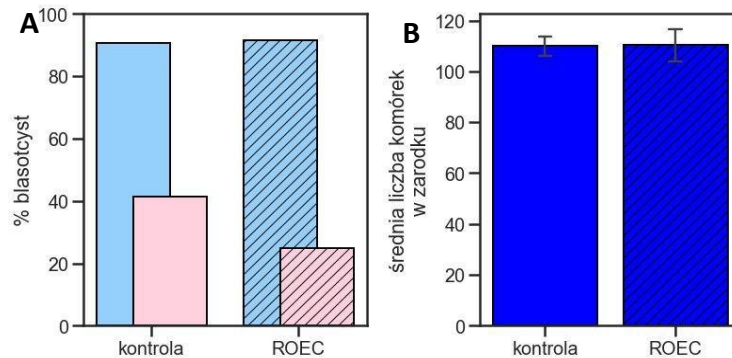
Pęcherzyki ROEC w hodowli zachowały epitelialną morfologię nabłonka jajowodu. Oznacza to, że posiadały one komórki wyposażone w rzęski (α -tubulina /kolor czerwony/) skierowane na zewnątrz pęcherzyka oraz białka cytoszkieletu: F-aktynę /kolor zielony/ usytuowaną pod błoną komórkową oraz β -kateninę /kolor fioletowy/ usytuowaną głównie w powierzchniach bocznych, stykających się ze sobą komórek. Zostało to potwierdzone za pomocą immunofluorescencji pośredniej (Rycina 8).



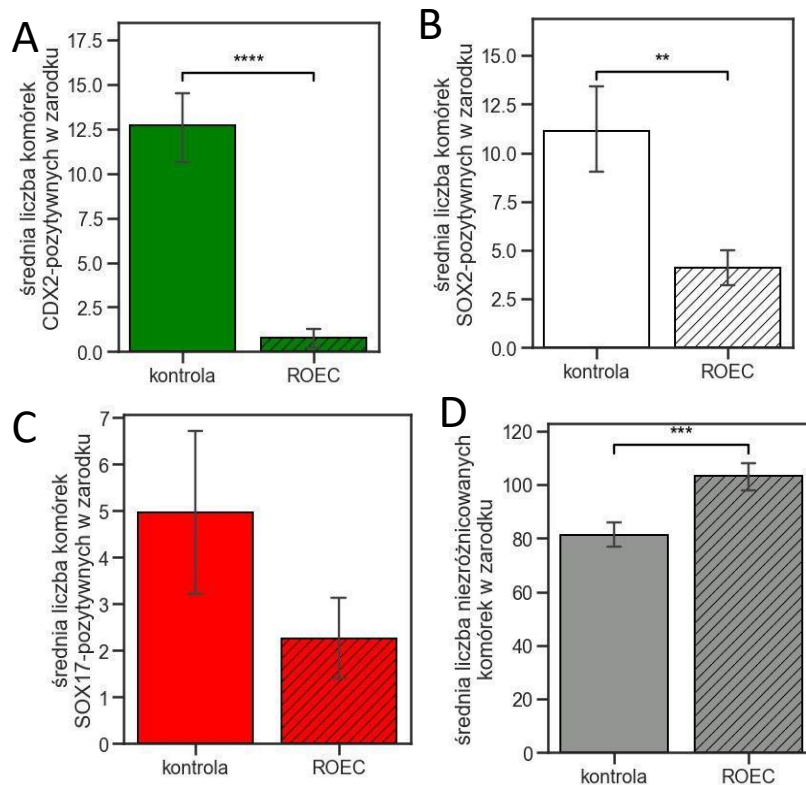
Rycina 8. Morfologia ROEC. Rzęski (α -tubulina–kolor czerwony), cytoszkielet (β -katenina–kolor fioletowy, f-aktyna–kolor zielony), jądra komórkowe (kolor niebieski). Fragment pęcherzyka ROEC z projekcji 3D zaznaczony przerywanymi liniami jest przedstawiony w projekcjach 2D. Zdjęcia z mikroskopu konfokalnego.

W grupie hodowanej w obecności pęcherzyków z ROEC, 83% zarodków osiągnęło stadium blastocysty (Wykres 15, A, kolumny zakreskowane, kolor niebieski) w tym 19% z wyklutło się (Wykres 15, A, kolumny zakreskowane, kolor różowy). W grupie kontrolnej 81% zarodków osiągnęło stadium blastocysty (Wykres 15, A, kolumny niezakreskowane, kolor niebieski) czego 39% wyklutło się (Wykres 15, A, kolumny niezakreskowane, kolor różowy). Zarodki z obu grup, które osiągnęły stadium blastocysty wykazywały taką samą średnią liczbę komórek (106 vs. 106) (Wykres 15, B). W grupie ROEC, w porównaniu z grupą kontrolną, brak wyraźnych różnic w liczbie zarodków osiągających stadium blastocysty (Wykres 15, A) oraz całkowitej liczbie komórek, (Wykres 15, B). Jednak hodowla zarodków króliczych z pęcherzykami ROEC znacząco wpływa na różnicowanie pierwszych linii komórkowych. Zarodki z grupy ROEC wykazywały średnio znacznie więcej komórek niezróżnicowanych w porównaniu z zarodkami z grupy kontrolnej (97% vs 70%) (Wykres 16, D). Porównując liczbę komórek wykazujących obecność markerów linii komórkowych: trofektodermy (CDX2) (Wykres 16, A), epiblastu (SOX2) (Wykres 16, B) oraz endodermy pierwotnej (SOX17) (Wykres 16, C) zauważono, że zarodki hodowane

w obecności pęcherzyków z ROEC, wykazują znacznie mniejszą liczbę komórek charakteryzującą się markerami dla tych linii: kolejno 4 vs. 13; 2 vs. 6; 2 vs. 16, w porównaniu z grupa kontrolną. Różnice w liczbie komórek niezróżnicowanych oraz zróżnicowanych w epiblast oraz trofektoderme są istotne statystycznie (dla I. kom. niezróżnicowanych: $p < 0,005$; dla EPI: $p < 0,01$; dla TE: $p < 0,001$).

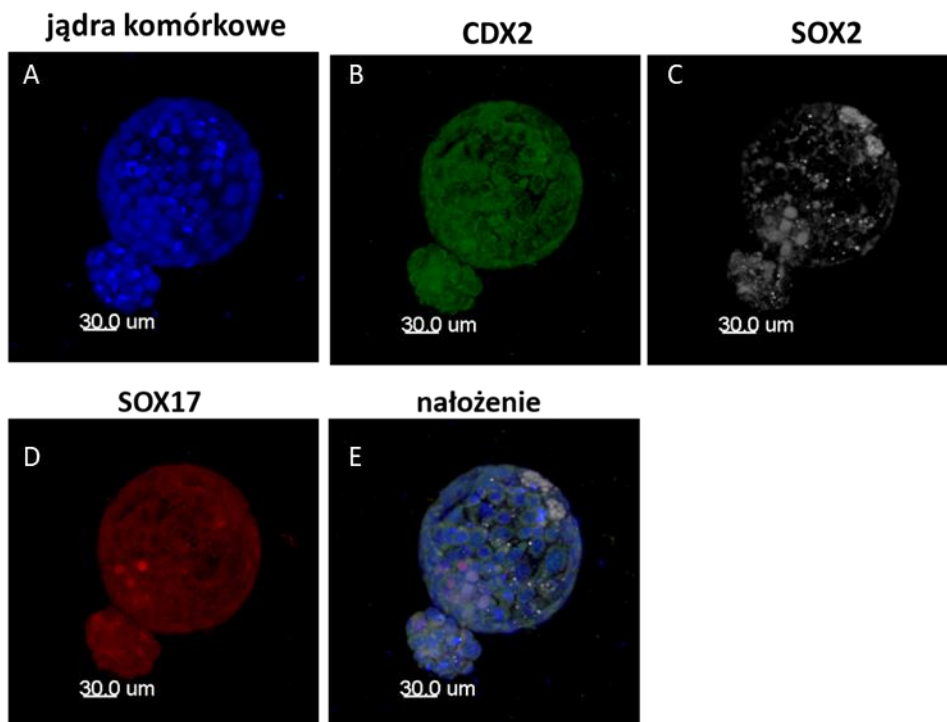


Wykres 15 (A) Odsetek zarodków, które osiągnęły stadium blastocysty (kolor błękitny) w tym procent zarodków, które wykłuły się (kolor różowy). (B) Średnia liczba komórek w blastocystach z grupy doświadczalnej i kontrolnej. Grupa doświadczalna (ROEC) – kolumny zakreskowane, grupa kontrolna (zarodki hodowane pożywcze kontrolnej) – kolumny niezakreskowane

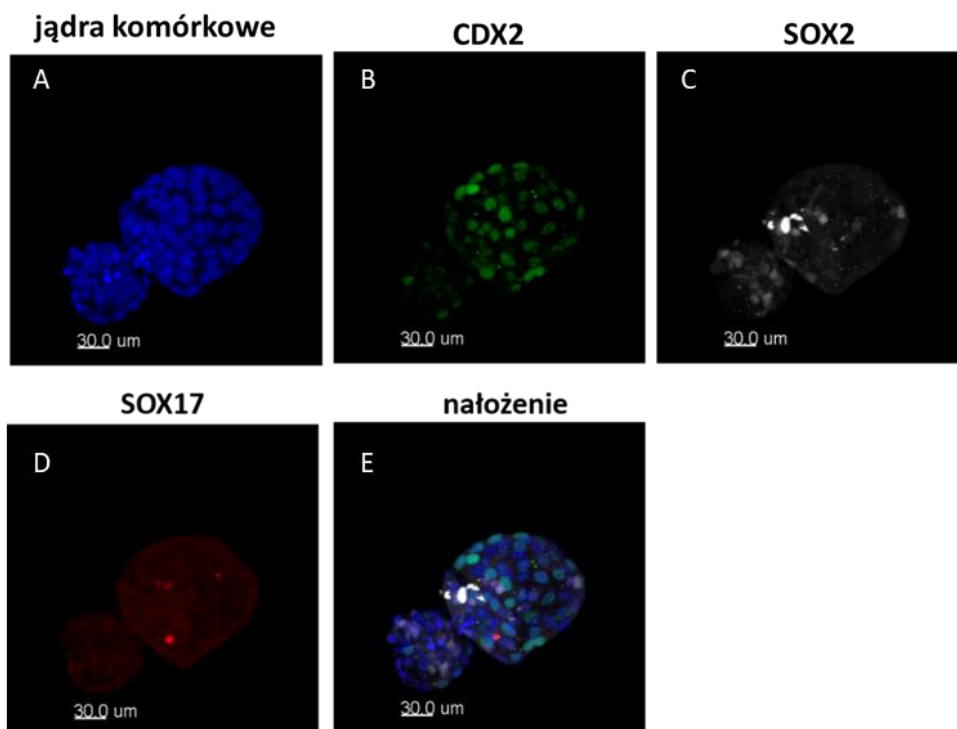


Wykres 16 Średnia liczba komórek TE - CDX2+ (A), EPI - SOX2+ (B), PrE - SOX17+ (C) oraz komórek niezróżnicowanych (D) w zarodkach grupy kontrolnej (niezakreskowane kolumny) oraz grupy hodowanej z pęcherzykami ROEC (zakreskowane kolumny); p-wartość: **** - $p < 0,001$; *** - $p < 0,005$; ** - $p < 0,01$; * - $p < 0,05$; . - $p < 0,1$

Przykładowe zdjęcia zarodków, z grupy ROEC i kontrolnej, uzyskane z mikroskopu konfokalnego, przedstawiające zróżnicowanie komórek zarodków na poszczególne linie komórkowe: epiblast – SOX2, endodermę pierwotną – SOX17 oraz trofektodermę – CDX2, zostały przedstawione na rycinie 9 i 10.



Rycina 9. Różnicowanie komórek w blastocystie króliczej stadium 5 dpc, uzyskanych z hodowli z ROEC. Użyte markery linii komórkowych TE-CDX2 (B), EPI-SOX2 (C), PrE-SOX17 (D), jądra komórkowe – barwnik Hoechst (A).



Rycina 10. Różnicowanie komórek w blastocystie króliczej stadium 5 dpc, uzyskanych z hodowli w pożywce kontrolnej – RDH. Użyte markery linii komórkowych TE-CDX2 (B), EPI-SOX2 (C), PrE-SOX17 (D), jądra komórkowe – barwnik Hoechst (A).

Hodowla przedimplantacyjnych zarodków królika z pęcherzykami z komórek nabłonka jajowodu królika (ROEC) nie wpływa na liczbę uzyskanych blastocyst oraz całkowitą liczbę komórek zarodków, natomiast znacząco zmniejsza liczbę komórek CDX2 i SOX2 w porównaniu z hodowlą w pożywce bez ROEC.

7. Dyskusja

Wiedza na temat przedimplantacyjnego rozwoju zarodkowego pochodzi w dużej mierze z wdrażanych technik hodowli zarodków *in vitro*. Obecnie techniki IVC są wykorzystywane powszechnie m.in. w klinikach wspomaganego rozrodu ludzkiego oraz w produkcji zwierzęcej. Hodowla zarodków *in vitro* jest także szczególnie ważnym narzędziem w badaniach z zakresu embriologii eksperymentalnej. Modelem zwierzęcym, na którym w większości oparta jest wiedza na temat rozwoju zarodkowego i powstawania pierwszych linii komórkowych w zarodkach ssaków jest mysz (*Mus musculus*). Jednak rozwój zarodkowy gryzoni, różni się pod wieloma względami od rozwoju innych ssaków, w tym również człowieka. Modelem, który wydaje się łączyć aspekty praktyczne uzyskiwania zarodków z cechami rozwoju zarodkowego podobnymi do innych ssaków (w tym naczelnych), jest królik (*Oryctolagus cuniculus*)¹²⁻¹⁸. Królik, uznawany niegdyś za klasyczny model w embriologii ssaków, nie jest obecnie wykorzystywany na szerszą skalę w badaniach rozwoju zarodkowego, w tym różnicowania pierwszych linii komórkowych.

Celem przedstawionych w tej pracy badań było poznanie jak warunki hodowli *in vitro* wpływają na naturalny przebieg rozwoju przedimplantacyjnych zarodków królika a szczególnie na różnicowanie pierwszych linii komórkowych. Odpowiedź na pytanie, które z zastosowanych w badaniach warunków hodowli *in vitro* umożliwiają uzyskanie zarodków najbardziej podobnych morfologicznie i molekularnie do zarodków *in vivo*, może pomóc w określeniu wymagań przedimplantacyjnych zarodków królika w warunkach hodowli *in vitro*. Ponadto poprzez użycie inhibitorów szlaków metabolicznych zbadano aktywność metaboliczną zarodków królika hodowanych *in vitro* na poszczególnych stadiach rozwoju. Badania te pozwoliły na określenie wymagań metabolicznych w przedimplantacyjnych zarodkach królika.

7.1 Aktywność metaboliczna w rozwijających się *in vitro* zarodkach królika

Zarodki królika podobnie jak innych ssaków charakteryzują się znacznymi zdolnościami adaptacyjnymi do różnych warunków hodowli *in vitro*. Dzięki tym zdolnościom zarodek jest w stanie przeżyć w szerokim spektrum pH, stężenia tlenu czy pożywek hodowlanych. Adaptacja i plastyczność zarodków w dużym stopniu wynikają z procesów metabolicznych związanych z rozwojem. Reakcje chemiczne, składające się na metabolizm, połączone są w szlaki lub łańcuchy i zachodzą w odrębnych miejscach w komórce. Jednak mimo przestrzennego rozlokowania, szlaki metaboliczne są ze sobą wzajemnie związane, gdyż produkty jednego szlaku są/mogą być substratem w kolejnym. Dzięki temu tworzona jest skomplikowana sieć oddziaływań, w której utrzymanie równowagi pomiędzy rozpadem oraz produkcją związków zapewnia prawidłowe funkcjonowanie komórek. Zachwianie tej równowagi może doprowadzić do śmierci komórek i obumarcia zarodka.

W drogach rodnych oraz w hodowli *in vitro* zarodek ma kontakt z egzogennymi substratami metabolicznymi takimi jak węglowodany, aminokwasy czy kwasy tłuszczowe, które dzięki aktywności odpowiednich ścieżek metabolicznych mogą zostać przemienione w energię oraz substancje niezbędne dla rozwoju zarodka. Ustalenie, które szlaki metaboliczne działają na danym etapie rozwoju oraz jaki jest ich wpływ na zarodek jest jednym z kluczowych aspektów zrozumienia rozwoju zarodkowego. Wiele badań na zarodkach ssaczych^{19–23}, w tym na zarodkach króliczych^{2,24,25} wskazuje na to, że metabolizm komórek zarodka zmienia się w czasie rozwoju przedimplantacyjnego. W początkowych etapach rozwoju do produkcji energii oraz substratów komórkowych, zarodki wykorzystują oddychanie tlenowe w szlaku fosforylacji oksydacyjnej (OXPHOS), na który składa się cykl Krebsa i łańcuch oddechowy. Natomiast na etapie rozwoju blastocysty, gdzie po raz pierwszy dochodzi do wyodrębnienia się dwóch typów linii: TE i ICM, zarodki wykorzystują oprócz OXPHOS także glikolizę. Jednak nie tylko szlaki prowadzące do powstania energii użytecznej metabolicznie odgrywają rolę w metabolizmie komórkowym. Równie istotne są przemiany substratów w szlaku pentozofosforanowym (PPP) prowadzące do powstania równoważnika redukcyjnego w postaci NADPH oraz substratów do produkcji nukleotydów^{26–28}. Obecnie dużą uwagę poświęca się badaniom dotyczącym przemian kwasów tłuszczowych w zarodkach w szlaku β -oksydacyjnym^{29–31}. Funkcją tego szlaku jest produkcja FADH₂ i NADH, a także acetylo-CoA, substratu niezbędnego do produkcji ATP w OXPHOS³².

Aktywność glikolizy i OXPHOS

Kluczowymi substratami energetycznymi zasilającymi szlaki metaboliczne są węglowodany i ich pochodne: pirogronian czy mleczan³³. W początkowych etapach rozwoju zarodkowego, jak zademonstrowano na zarodkach płazów³⁴ oraz potwierdzono na zarodkach ssaków³⁵, energia niezbędna do rozwoju komórek zarodka pozyskiwana jest poprzez szlak fosforylacji oksydacyjnej (OXPHOS). Zarodki na etapie bruzdkowania mają niewielkie potrzeby energetyczne praktycznie w całości zaspokajane przez niską aktywność OXPHOS^{36,37}. Od stadium moruli (~72 *hpc*) zarodek zaczyna wykorzystywać glukozę obecną w płynie macicznym lub w pożywkach, za pomocą szlaku glikolizy³⁵. Oznacza to, że na etapie blastocysty zarodek pozyskuje energię oraz substraty do pozostałych szlaków metabolicznych wykorzystując zarówno OXPHOS jak i glikolizę. Wynika to z faktu, że na etapie moruli zaczynają się wyodrębniać komórki prekursorowe dwóch linii komórkowych: TE oraz ICM. Linie te cechują się różnymi wymaganiami metabolicznymi^{22,38,39}. ICM oraz komórki pochodzące z ICM, jakimi są zarodkowe komórki macierzyste (ESc), mają duży potencjał proliferacyjny, w związku z czym korzystają głównie z glikolizy. Wysoka aktywność glikolizy nie wytwarza znacznych ilości ATP (w porównaniu z OXPHOS) ale zapewnia komórkom ICM substraty budulcowe dla białek, tłuszczów i kwasów nukleinowych^{40,41}. Natomiast komórki TE wymagają produkcji dużej ilości ATP ze względu na aktywność obecnych w błonach komórek TE, pomp Na⁺/K⁺ zależnych od ATP. Działanie tych pomp

umożliwia komórkom TE utworzenie i podtrzymanie napięcia jamy blastocysty. Zatem w komórkach TE aktywna jest ścieżka OXPHOS zapewniająca produkcję dużych ilości ATP (w porównaniu z glikolizą)⁴²⁻⁴⁵. Różnicowanie komórek na TE i ICM wiąże się także z wzrastającym zapotrzebowaniem na tlen jak pokazały badania na zarodkach mysich, ludzkich i bydłych⁴⁶⁻⁴⁸.

Jak wynika z badań wykonanych w latach 70-tych XX w. w przedimplantacyjnych zarodkach królika, podobnie jak u innych gatunkach ssaków^{22,49,50}, OXPHOS wydaje się być dominującym szlakiem pozyskiwania energii na etapie bruzdkowania, natomiast na etapie blastocysty dominuje glikoliza². Zatem mimo, że aktywność metaboliczna OXPHOS oraz glikolizy w zarodkach króliczych była już wcześniej badana², w niniejszej pracy postanowiono porównać działanie kilku inhibitorów dla obu tych szlaków. Użyte inhibitory wykazują hamujące działanie na konkretny szlak, jednak oddziałują na różne jego etapy. Dodatkowym celem badań było sprawdzenie czy standardowa pożywka do hodowli zarodków królika – RDH, wpłynie na aktywność inhibitorów danego szlaku. Jak wykazują badania, niektóre substraty energetyczne obecne w pożywkach (np. glukoza czy aminokwasy) wpływają na aktywność metaboliczną zarodków, dzięki czemu do pewnego stopnia mogą one dostosować swój metabolizm, by niwelować skutki działania niekorzystnych warunków panujących w środowisku, w tym niwelować działanie inhibitorów⁵¹⁻⁵³.

Aktywność OXPHOS w trakcie przedimplantacyjnego rozwoju zarodków królika badano przy użyciu trzech inhibitorów tego szlaku: (1) antymycyny A (ANTY-A), (2) 2,4-dinitrofenolu (2,4-DNF) oraz (3) IACS-010759 (IACS).

Wyniki badania opisane w niniejszej pracy wykazały, że zablokowanie OXPHOS przez ANTY-A oraz 2,4-DNF w stadium zygoty skutkuje obumarciem króliczych zarodków w stadium 2- i 4-komórkowym co potwierdza tezę, że OXPHOS jest kluczowym szlakiem w początkowych stadiach rozwoju. Natomiast, zablokowanie OXPHOS na późniejszym etapie rozwoju zarodków króliczych (od stadium moruli) przez 2,4-DNF, w przeciwieństwie do ANTY-A, nie powoduje obumarcia zarodków króliczych a jedynie obniża odsetek zarodków osiągających stadium blastocysty. Na podstawie uzyskanych wyników można sugerować, że zmniejszenie produkcji ATP wywołane przez 2,4-DNF tylko częściowo wpływa na rozwój późnych zarodków królika. Zatem może to potwierdzać fakt, że szlak OXPHOS w zarodku, w którym zachodzi kawitacja nie pełni już tak istotnej roli, jak na wczesnych etapach rozwoju. Inną przyczyną dla której 2,4-DNF nie spowodowało obumarcia zarodków króliczych od stadium moruli może być fakt, że inhibitor ten poprzez zmniejszenie produkcji ATP, może zmniejszać tym samym stres oksydacyjny w komórkach. Antyoksydacyjny wpływ 2,4-DNF potwierdziły badania z wykorzystaniem blastocyst bydłych⁵⁴. Na uzyskanie 57% zarodków osiągających stadium blastocysty w hodowli z inhibitorem 2,4-DNF od stadium moruli, mogła również wpłynąć obecność w pożywce rozpuszczalnika 2,4-DNF – metanolu. Ze względu na zbyt małą ilość materiału doświadczalnego przeprowadzono jedynie hodowlę kontrolą (RDH + metanol) dla zarodków od stadium zygoty. Nie

przeprowadzono hodowli kontrolnej dla zarodków hodowanych od stadium moruli. Wynikiem hodowli kontrolnej od zygoty było uzyskanie 60% zarodków osiagających stadium blastocysty. Zatem interpretacja wyniku tego doświadczenia nie jest możliwa, jednak nie należy wykluczać potencjalnego wpływu metanolu na rozwój króliczych zarodków.

Hodowla zarodków króliczych od stadium zygoty i moruli w pożywce z inhibitorem kompleksu I – IACS powodowała, że część zarodków osiagała stadium blastocysty. Przy czym zarodki, które nie osiagnęły stadium blastocysty przestawały się rozwijać stopniowo, na wszystkich ocenianych etapach rozwoju (w stadium 2-/4-komórkowym, stadium kompacji, moruli i w czasie kawitacji). Może to oznaczać, że IACS w zarodkach króliczych jedynie częściowo hamuje aktywność OXPHOS. Podobny wynik działania IACS uzyskano w badaniach komórek nowotworowych białaczki limfocytowej (CLL), gdzie wykazano, że IACS jedynie zmniejsza aktywność OXPHOS i nie powoduje śmierci wszystkich komórek⁵⁵. Komórki CLL wykazywały przy tym znaczną aktywność glikolizy, jako mechanizmu kompensującego obniżenie aktywności OXPHOS.

Wpływ aktywności glikolizy na rozwój przedimplantacyjnych zarodków królika badano przy użyciu dwóch inhibitorów tego szlaku: 2-deoksyglukozy (DDGLU) i kwasu 3-bromopirogronianowego (3-BP). Wyniki niniejszej pracy potwierdzają, że zablokowanie glikolizy w zarodkach królika od stadium zygoty nie wpływa na ich rozwój do stadium moruli. Jak wykazały badania na zarodkach króliczych, od stadium moruli wzrasta aktywność glikolizy², co może potwierdzać, że użycie inhibitorów glikolizy w hodowli zmniejszyło odsetek zarodków przechodzących proces kawitacji i osiagających stadium blastocysty, w porównaniu z kontrolą. Jednak mimo użytych inhibitorów glikolizy ponad 50% zarodków osiagała stadium blastocysty, co może być spowodowane składem pożywki hodowlanej RDH. Jak wynika z innych badań z wykorzystaniem DDGLU na zarodkach króliczych, hamujący wpływ inhibitora można zniwelować, dodając do pożywki glukozę². Użyta w niniejszych badaniach pożywka RDH zawiera znaczne ilości glukozy (14,07 mmoli), co może tłumaczyć uzyskane wyniki. Dodatkowo uzyskane wyniki mogą świadczyć o tym, że glikoliza jest aktywna w komórkach, jednak nie jest jedyną ścieżką pozyskiwania energii. Jak wykazały badania, na etapie kawitacji i tworzenia blastocysty aktywna jest nadal ścieżka OXPHOS⁵⁶ a także szlak β -oksydacyjny^{29,57}. Być może w zarodkach króliczych istnieje mechanizm kompensacji, dzięki któremu mimo zahamowania aktywności glikolizy, w zarodku możliwe jest tworzenie substratów koniecznych dla rozwoju za pomocą innych ścieżek metabolicznych.

Aktywność szlaku pentozofosforanowego (PPP)

Rola aktywności szlaku pentozofosforanowego w zarodkach ssaczych nie jest do końca poznana. Wzmoczoną aktywność PPP obserwuje się w zarodkach świńskich w stadium zygoty oraz w stadium 2-komórkowym⁵⁸, w zarodkach owczych od stadium 2- do 16-komórkowego²⁶, natomiast w zarodkach bydłych w stadium 6-komórkowym⁵⁹. Uważa się również, że w zarodkach bydłych PPP

odgrywa szczególną rolę w przemianach glukozy do stadium 16-komórkowego, na którym zaczyna wzrastać aktywność glikolizy. W zarodkach mysich wzmożona aktywność szlaku PPP obserwowana jest w stadium 2-komórkowym i w stadium moruli⁶⁰. Związane jest to prawdopodobnie z tym, że od stadium moruli wzrasta tempo proliferacji komórek i zapotrzebowanie na tlen, zatem konieczna jest wzmożona produkcja kwasów nukleinowych oraz, aby zachować równowagę oksydacyjno-redukcyjną, wzrasta również zapotrzebowanie na NADPH. Ostatnio stwierdzono, że w zarodkach mysich aktywność PPP jest niezbędna do zajścia kawitacji i rozwoju blastocysty⁷. W zarodkach króliczych aktywność szlaku pentozofosforanowego nie była do tej pory badana, stwierdzono natomiast obecność metabolitów PPP w stadium blastocysty⁶¹. W niniejszej pracy inhibicję szlaku pentozofosforanowego uzyskano za pomocą dwóch inhibitorów: 6-aminonikotynamidu (6-AN) oraz diphenyleneiodonium (DPI).

W niniejszej pracy zaobserwowano, że inhibicja szlaku PPP w zarodkach królika za pomocą DPI doprowadziła do ich obumarcia, niezależnie czy hodowla prowadzona była od stadium zygoty czy stadium moruli. Natomiast hamując aktywność PPP poprzez 6-AN stwierdzono, że zarodki królika hodowane od zygoty rozwinęły się do stadium blastocysty. Podobny wpływ DPI i 6-AN na PPP uzyskano hodując oocyty i zarodki świni⁶². DPI w szlaku pentozofosforanowym blokuje powstawanie NADP⁺ z NADPH³. Działanie tego inhibitora na PPP może zaburzać rozwój komórek zarodka na kilku płaszczyznach. Po pierwsze, DPI może wpływać bezpośrednio na PPP przez zablokowanie produkcji NADP. W PPP NADP jest substratem dwóch reakcji, w wyniku których powstają 6-fosfoglukono- δ -lakton oraz rybulozo-5-fosforan. Zablokowanie PPP przez DPI prowadzi w rezultacie do zablokowania szlaku i braku produkcji rybulozo-5-fosforanu, który jest substratem do syntezy nukleotydów budujących RNA oraz jest prekursorem deoksyrybozy. Po drugie, NADP jest także substratem w reakcjach biosyntezy kwasów tłuszczowych a jak dowiedziono na zarodkach myszy, synteza kwasów tłuszczowych jest niezbędna dla ich rozwoju⁶³. Po trzecie, nieodpowiednia proporcja NADPH/NADP powoduje zaburzenie balansu oksydacyjno-redukcyjnego w komórkach, indukując tym stres oksydacyjny^{4,64}. Po czwarte, pokazano, że DPI może blokować nie tylko oksydazę NADPH ale też inne kofaktory enzymatyczne m.in. dehydrogenazę NADPH, oksydazę ksantynową (XO) lub syntazę tlenku azotu (NOS)^{65,66}, co również może być przyczyną obumarcia komórek zarodków⁶⁷⁻⁷⁰. Po piąte, zablokowanie oksydazy NADPH hamuje wytwarzanie ROS w postaci nadtlenu wodoru (H₂O₂) i anionu ponadtlenkowego (O₂^{•-})^{71,72}. W nadmiarze ROS są odpowiedzialne za toksyczne efekty stresu oksydacyjnego w komórkach jednak, z drugiej strony, obecność ROS w komórkach jest niezbędna, gdyż pełnią one rolę regulatorów ścieżek sygnałowych oraz transkrypcji i ekspresji genów^{73,74}, zatem zablokowanie produkcji ROS również mogło przyczynić się do braku rozwoju zarodków królika w obecności inhibitora PPP.

Wpływ zablokowania szlaku PPP przez inhibitor 6-AN na zarodki nie jest w pełni poznany. W

zarodkach mysich wpływa on na oksydacyjną fazę PPP, w której produkowany jest NADPH i rybuluzo-5-fosforan, prowadząc do akumulacji 6-fosfoglukonianu co w rezultacie skutkuje zatrzymaniem rozwoju zarodka w stadium kompaktnej moruli ⁷. Wyniki niniejszej pracy wskazują natomiast, że zarodki królicze są w stanie rozwinąć się do stadium blastocysty w obecności 6-AN w pożywce. Być może jest to skutkiem bogatego składu pożywki RDH, zawierającego glukozę oraz antyoksydanty w postaci BSA ⁷⁵, w której hodowane były zarodki, gdyż jak dowiedziono urydyna i/lub antyoksydanty mogą odwrócić inhibicję PPP ⁷. Ponadto 6-AN wpływa jedynie na oksydacyjną fazę PPP. Jak dowiedziono, oksydacyjna faza PPP odgrywa mniejszą rolę w rozwoju zarodków niż faza nieoksydacyjna, zatem może to oznaczać, że produkcja substratów dla nukleotydów może zachodzić mimo inhibicji fazy oksydacyjnej ^{76,77}.

Powyższe wyniki wskazują, że w rozwoju zarodków królika *in vitro* szlak pentozofosforanowy oraz równowaga oksydacyjno-redukcyjna odgrywają istotną rolę zarówno na etapie bruzdkowania jak i blastocysty, jednak niezbędne są dalsze badania w celu zrozumienia wpływu wpływ PPP na rozwój zarodków ssaków.

Aktywność szlaku β -oksydacyjnego

Większość dotychczasowych badań metabolizmu zarodków królika skupiała się na szlakach przemian cukrów w energię w postaci ATP, to jest na OXPHOS i glikolizie ^{2,24,25}, natomiast metabolizm kwasów tłuszczowych i wytwarzanie energii w szlaku β -oksydacyjnym (β -OX) nie były badane. Podejrzewa się, że zarodki królika, które są zdolne do 3 serii podziałów bruzdkowania *in vitro* w pożywce nie zawierającej egzogennych źródeł energii mają zmagazynowaną pewną ilość endogennych kwasów tłuszczowych, mogących służyć jako źródło energii użytecznej metabolicznie ⁵². Potwierdza to fakt, że zarodki królika w hodowli *in vitro* na etapie bruzdkowania mogą wykorzystywać długołańcuchowe (oprócz arachidowego) oraz niektóre krótkołańcuchowe kwasy tłuszczowe jako jedyne źródło energii ⁵¹. Dodatkowo w trakcie rozwoju okołimplantacyjnego obserwuje się zwiększanie ilości nasyconych kwasów tłuszczowych w blastocystach oraz płynie macicznym ⁷⁸, co może oznaczać, że są one potrzebne zarodkom króliczym w rozwoju.

W badaniach niniejszej pracy w celu sprawdzenia wpływu aktywności szlaku β -OX na rozwój zarodków królika użyto Etomoxiru (ETMOX) ⁷⁹. Związek ten nieodwracalnie blokuje białko CPT-1 (karnityno palmitoyltransferazę I) zlokalizowane na zewnętrznej błonie mitochondriów. Inhibicja CPT-1 powoduje, że wolne kwasy tłuszczowe nie mogą przemieścić się do wnętrza mitochondriów i stać się substratami w szlaku β -OX. Szlak ten jest niezwykle istotny kiedy w komórkach wzrasta zapotrzebowanie na energię w postaci ATP, gdyż dzięki β -oksydacji kwasów tłuszczowych, możliwie jest wytworzenie 2-razy większej liczby cząsteczek ATP niż w wyniku utleniania węglowodanów poprzez OXPHOS ^{80,81}. Badania na komórkach nowotworowych wykazały, że inhibicja szlaku β -OX

poprzez ETMOX, skutkowało nie tylko obniżeniem ilości produkowanego ATP ale także obniżeniem ilości NADPH oraz zredukowanego glutationu, co z kolei powodowało nadprodukcję ROS⁸². Oznacza to, że szlak ten nie tylko bierze udział w tworzeniu energii ale bierze także udział w redukcji stresu oksydacyjnego.

Wyniki niniejszej pracy pokazują, że w przedimplantacyjnych zarodkach królika aktywność szlaku β -OX może być skorelowana z tworzeniem się jamy blastocysty. Zauważono, że odsetek zarodków króliczych rozwijających się w obecności inhibitora β -OX nie zmieniał się od stadium zygoty do stadium moruli natomiast od stadium moruli zarodki zatrzymywały się w rozwoju i tylko część z nich przeszła proces kawitacji. Podobne wyniki uzyskano w badaniach prowadzonych na zarodkach mysich, w których blokowano szlak β -OX (w tym, za pomocą ETMOX)^{29,83}. Wykazały one, że szlak β -OX jest szczególnie istotny w procesie tworzenia jamy blastocysty, gdyż ponad 50% zarodków hodowanych w obecności ETMOX nie przechodziło procesu kawitacji. Dodatkowo w przytoczonych badaniach zauważono, że część zarodków mysich obumierała w stadium 8-komórkowym²⁹. Podobnego efektu nie zaobserwowano na zarodkach królika w badaniach niniejszej pracy. Zmniejszenie odsetka zarodków przechodzących proces kawitacji i osiągających stadium blastocysty, związane z blokowaniem szlaku β -OX, może wynikać z niewystarczającej ilości energii produkowanej przez komórki. Na etapie kawitacji zwiększona produkcja energii w postaci ATP jest konieczna ze względu na działanie w komórkach zewnętrznych zarodka zależnej od ATP pompy Na^+/K^+ ³⁹. Ponadto komórki TE pobierają dużo więcej tlenu i posiadają więcej mitochondriów niż komórki ICM^{84,85}, co wiąże się ze zwiększonym stresem oksydacyjnym. Prawdopodobnie rozpad kwasów tłuszczowych w szlaku β -OX jest potrzebny aby jednocześnie zapewnić energię oraz siłę redukcyjną w postaci NADPH i FADH_2 potrzebnych zarodkom do tworzenia jamki i redukcji stresu oksydacyjnego. Nie jest zatem wiadomo dlaczego część zarodków króliczych jednak przechodzi proces kawitacji i osiąga stadium blastocysty. Proponowaną hipotezą jest, że inhibicja szlaku β -OX w niektórych zarodkach kompensowana jest wzrostem aktywności innych szlaków metabolicznych i zwiększonym wykorzystaniem egzogennych substratów energetycznych z pożywek do hodowli *in vitro*, jednak potrzebne są dalsze badania, by to stwierdzić.

7.2 Schemat różnicowania pierwszych linii komórkowych w przedimplantacyjnych zarodkach królika *in vivo*

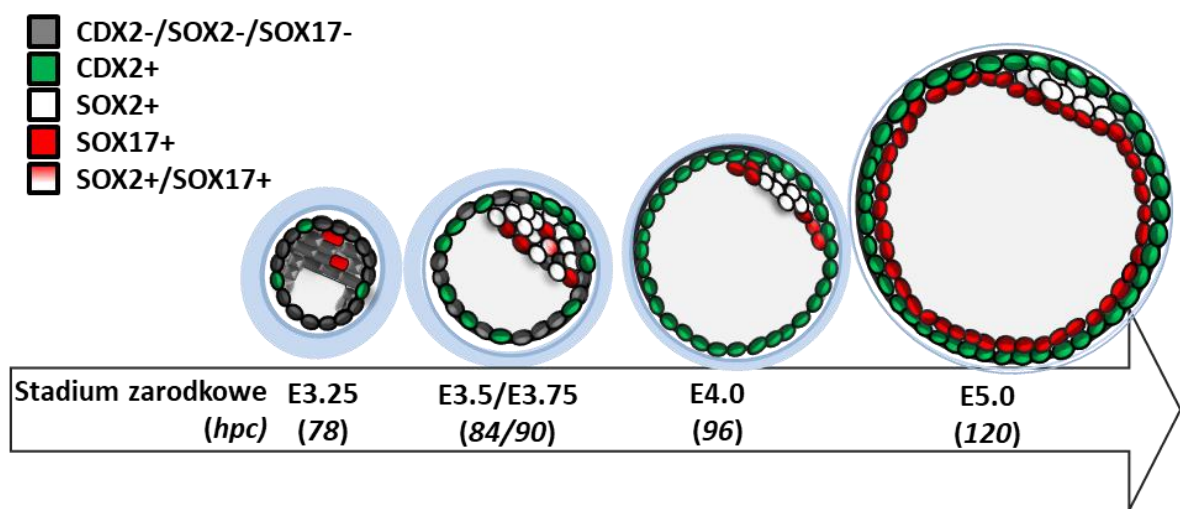
W pierwszej części badań określono schemat powstawania pierwszych linii komórkowych w przedimplantacyjnych zarodkach królika *in vivo*. Celem tych doświadczeń było ustalenie i opisanie wzorca różnicowania przedimplantacyjnych zarodków króliczych. W dalszych etapach badań, ustalony wzorec umożliwił porównanie zarodków hodowanych *in vitro* z zarodkami uzyskanymi *in vivo*. W

zarodkach porównywano całkowitą liczbę komórek oraz liczbę komórek, w których były obecne markery pierwszych linii komórkowych.

Obecnie wiedza dotycząca powstawania pierwszych linii komórkowych w ssaczych zarodkach, oparta jest głównie z badań na modelu mysim⁸⁶⁻⁹¹, jednak wiele badań wskazuje, że część procesów związanych z rozwojem zarodka może zachodzić inaczej u gryzoni niż u innych ssaków, w tym u bydła^{92,93} oraz ssaków naczelnych⁹⁴.

Różnicowanie pierwszych linii komórkowych w zarodkach królika jak dotąd było przedmiotem niewielu badań^{18,95-97}. Ramy czasowe różnicowania endodermy pierwotnej i epiblastu w zarodkach króliczych *in vivo* do stadium E4.5 opisano w publikacji Piliszek i wsp.¹⁸, a w niniejszej pracy zostały one uzupełnione danymi dotyczącymi zarodków w stadiach E5.0 i E6.0. Czynniki odpowiedzialne za różnicowanie oraz ramy czasowe powstawania linii trofektodermi w zarodkach *in vivo* są obecnie przedmiotem intensywnych badań w Zakładzie Embriologii Doświadczalnej IGBZ, jednak ich wyniki nie zostały dotychczas opublikowane. Do identyfikacji linii epiblastu i endodermy pierwotnej użyto specyficznych dla tych linii markerów, odpowiednio – SOX2 i SOX17. Użycie markera trofektodermi – CDX2, zostało podyktowane faktem, iż jak dotąd jest to jedyny znany marker lokalizujący się specyficznym w komórkach TE w zarodku królika⁹⁸, chociaż nie jest on niezbędny do powstawania TE⁹⁹. Inne markery TE, takie jak GATA3 i EOMES – prawdopodobnie pojawiają się w rozwoju zarodkowym królika znacznie później i lokalizują się w niespecyficznym (A. Piliszek, K. Bartowska – dane nieopublikowane).

Na podstawie wyników uzyskanych w tej pracy oraz badań Piliszek i wsp.¹⁸ opracowano schemat, obrazujący chronologię różnicowania zarodków królika na trzy pierwsze linie zarodkowe (Schemat 5).



Schemat 1. Wzorzec różnicowania zarodków królika *in vivo*.

Warto zaznaczyć, że w zarodkach króliczych *in vivo*, liczba komórek zwiększa się wykładniczo i w stadium E3.25 wynosi >128 komórek, w stadium E3.5 >256 komórek, w stadium E3.75 >512 komórek, w stadium E.4.0 > 1024 komórek, w stadium E5.0 >2048, w stadium E6.0 >4096 komórek ¹⁸.

7.3 Charakterystyka przedimplantacyjnych zarodków królika hodowanych *in vitro*

Wieloletnie badania mające na celu opracowanie składu pożywek i metod hodowli naśladujących warunki panujące w drogach rodnych samicy spowodowały, że obecnie z dużą skutecznością i powtarzalnością możliwa jest hodowla zarodków *in vitro* od zygoty do stadium blastocysty, umożliwiającą tym samym badanie ich przedimplantacyjnego rozwoju. W przypadku zarodków królika, pełny rozwój przedimplantacyjny uzyskano, zarówno w wieloskładnikowych, jak i prostych pożywkach, opartych o skład soli fizjologicznych ^{1,8,100–104}. Jednak mimo uzyskiwania przez zarodki w hodowli *in vitro*, poszczególnych etapów rozwoju (m.in. kompaktacji, kawitacji), zauważa się wiele różnic morfologicznych, epigenetycznych i molekularnych pomiędzy rozwojem zarodków w warunkach *in vitro* i *in vivo*.

Wyniki badań przedstawionych w niniejszej pracy, w której badano zarodki w stadium blastocysty 5 i 6 *dpc* jak również badania innych autorów pokazują, że zarodki królika hodowane *in vitro* w porównaniu z *in vivo*, charakteryzują się mniejszą średnicą zarodka a co za tym idzie mają znacząco mniejszą liczbę komórek ^{100 105 106}. Zarodki hodowane *in vitro* charakteryzują się także mniejszą masą białek (od zygoty do 7.0 *dpc*) niż te uzyskiwane *in vivo* ¹⁰⁷. Budowa struktur komórkowych: mitochondriów, rybosomów, retikulum endoplazmatycznego czy jąderka do stadium 3.5 *dpc* jest zbliżona do obserwowanej w zarodkach *in vivo*, natomiast w stadium 4.0 i 5.0 *dpc* wyraźne są różnice w budowie tych struktur ¹⁰⁸. Warunki *in vitro* wpływają także na poziom ekspresji mRNA wielu kluczowych genów takich jak: *Oct*, *Nanog*, *Klf4* czy *Sox2* ⁹⁵. Hodowla *in vitro* wpływa również na poziom modyfikacji epigenetycznych DNA ^{109,110}. W zarodkach królika hodowanych *in vitro* nie występuje też przebudowa osłonek ^{111–113}. Jak pokazują wyniki przedstawione w niniejszej pracy oraz inne źródła ⁸ skutkuje to nieprawidłowym wykluwaniem się zarodka w stadium blastocysty („wyklucie ósemkowe”) ⁹. Zarodki wykluwające się w sposób ósemkowy charakteryzują się нефизjologiczną morfologią węzła zarodkowego. Dodatkowo brak osłonki mucynowej w zarodkach hodowanych od stadium zygoty powoduje, że tylko niewielki odsetek zarodków poddanych embriotransferowi implantuje się ^{1,114}.

Wyniki uzyskane w niniejszej pracy świadczą również o tym, że zarodki królika hodowane *in vitro* różnią się znacząco pod względem różnicowania pierwszych linii komórkowych od zarodków rozwijających się *in vivo*. Zarodki królicze hodowane *in vitro* do stadiów 5.0 i 6.0 *dpc* charakteryzowały się podobnym stopniem różnicowania pierwszych linii komórkowych jaki obserwowano w zarodkach E3.25, E3.5 lub E3.75 rozwijających się *in vivo*. W większości przypadków blastocysty 5.0 i 6.0 *dpc*

uzyskane *in vitro* posiadały komórki z markerami charakterystycznymi dla poszczególnych linii komórkowych: CDX2 – TE, SOX2 – EPI oraz SOX17 – PrE, jednak liczba tych komórek była znacznie mniejsza niż w zarodkach E5.0 i E6.0 rozwijających się *in vivo*. Ponadto znaczna liczba komórek w zarodkach hodowanych *in vitro* nie wykazywała obecności markerów CDX2, SOX2 i SOX17.

W hodowanych *in vitro* zarodkach obserwujemy mały odsetek komórek EPI i PrE. Może wynikać z nieprawidłowości związanych z powiększaniem się jamki blastocysty^{115,116}. Jak wykazały badania, zarodki królika hodowane *in vitro* w stadium 3.5 *dpc* charakteryzują się nieprawidłową budową połączeń międzykomórkowych w tym połączeń ścisłych (TJ) oraz niewielką liczbą desmosomów¹⁰⁸. Wadliwa budowa TJ w czasie powstawania jamy blastocysty mogła doprowadzić do uzyskania nieprawidłowych wartości siły nacisku płynu na warstwę komórek TE w czasie powstawania jamy blastocyst¹¹⁶. Niedawne badania na zarodkach mysich pokazują, że nacisk na ściany komórek blastocysty wpływa na rozmiar zarodka oraz na różnicowanie i segregację komórek EPI i PrE¹¹⁵.

Podobnie jak w blastocystach E3.5 i E3.75 rozwijających się *in vivo*, w zarodkach 5.0 *dpc* i 6.0 *dpc* hodowanych *in vitro* obserwowano duży odsetek komórek TE nie wykazujących obecności markera Cdx2. Obecnie nie znany jest mechanizm kierowania komórek zarodka królika na drogę różnicowania w TE. W zarodkach mysich, według hipotezy inside-outside, już w stadium 8-16 komórkowego zarodka ustala się podział na pierwsze linie komórkowe: TE i ICM¹¹⁷. Komórki, które w wyniku podziałów komórkowych zlokalizowane będą na zewnątrz zarodka wejdą na drogę różnicowania w TE. Jak zostało później potwierdzone, komórki zewnętrzne dziedziczą domeny polaryzacyjne¹¹⁸⁻¹²⁰ i wykazują aktywność innych szlaków sygnałowych niż komórki wewnętrzne¹²¹. Jednym z czynników transkrypcyjnych odpowiedzialnych za tworzenie TE w zarodkach mysich jest białko TEAD4^{122,123}. Badania dotyczące wpływu czynnika Tead4 na rozwój zarodkowy myszy wykazały, że w zarodkach pozbawionych ekspresji *Tea4* zewnętrzne, spolaryzowane komórki nie wykazują obecności markerów charakterystycznych dla trofektodermy takich jak: Cdx2, Eomes, Fgfr2. Białko CDX2 w zarodkach mysich pojawia się w stadium 8-komórkowym^{87,122,124}, po czym w stadium blastocysty występuje jedynie w TE. W zarodkach króliczych uzyskanych *ex vivo* czynnik transkrypcyjny Cdx2 zaczyna być wykrywany w komórkach TE dopiero w stadium blastocysty E3.25. Brak markera Cdx2 w komórkach TE zarodków królika hodowanych *in vitro*, może być związany z faktem, że w stadium E3.25–E3.5 *in vivo*, zachodzą istotne zmiany w rozwoju, związane również z procesem różnicowania komórek. W tym czasie zarodek królika przechodzi kawitację oraz przemieszczając się przez cieść jajowodu zmienia środowisko rozwoju z jajowodu na macicę. Przypuszczać można, że warunki hodowli *in vitro* wystarczające zarodkowi na etapie bruzdkowania, nie wspierają dostatecznie rozwoju zarodka królika na etapie tworzenia się blastocysty. Może się to wiązać z faktem, że między zarodkami królika hodowanymi *in vitro* a *in vivo*, od stadium 3.5 obserwowane są różnice w budowie organelli komórkowych m.in. mitochondriów¹⁰⁸. Analiza budowy mitochondriów w zarodkach królika w stadium blastocysty

wykazała, że są one większe oraz posiadają znacznie więcej grzebieni mitochondrialnych, niż w stadium moruli ¹²⁵ Odmienność struktury mitochondriów w stadium blastocysty oznacza, że są one bardziej aktywne metabolicznie. Jak potwierdzają badania na modelu mysim, bydłowym, króliczym, świńskim oraz ludzkim w stadium blastocysty zmienia się zapotrzebowanie komórek zarodka na substraty energetyczne oraz wyraźne stają się różnice między metabolizmem komórek TE oraz ICM, związane z funkcjami pełnionymi przez komórki tych dwóch linii ^{20,22,23,38,39,126}. Komórki TE w celu wytworzenia, powiększenia i utrzymania jamki, wymagają - ze względu stałe działanie zależnej od ATP pompy Na⁺/K⁺ - znacząco więcej energii pochodzącej z rozpadu ATP. Można więc sądzić, że nieprawidłowa budowa mitochondriów w zarodkach hodowanych *in vitro*, wpływa na metabolizm i funkcje komórek TE. Może być to związane z aktywnością czynnika transkrypcyjnego Tead4. W zarodkach mysich czynnik Tead4 odpowiedzialny jest za aktywację Cdx2 oraz bierze udział w przeciwdziałaniu stresowi oksydacyjnemu ^{127,128}. Czynnik Tead4 przeciwdziała powstawaniu reaktywnych form tlenu (RFT), powstających jako skutek uboczny działania ścieżki metabolicznej fosforylacji oksydacyjnej (OXPHOS) w komórkach TE. Wykazano, że zarodki mysie pozbawione genu *Tead4* posiadały mitochondria o obniżonym potencjale błony mitochondrialnej a komórki TE tych zarodków produkowały znacząco więcej RFT. Wiele badań dowodzi również, że mysie zarodki *Tead4*^{-/-} nie są w stanie utrzymać ekspresji genów charakterystycznych dla TE m.in. *Cdx2* a także wytworzyć jamki blastocysty oraz zaimplantować się w macicy ^{123,127,129-133}. Jednak w części badań, zmiana warunków hodowli, w tym dodanie antyoksydantów do pożywek hodowlanych skutkowało rozwinięciem się zarodków *Tead4*^{-/-} do stadium blastocysty oraz lokalizacją białka CDX2 w komórkach TE tych zarodków ^{123,127}. Opisane powyżej wyniki badań mogą świadczyć o tym, że Tead4 pełni ważną funkcję w przeciwdziałaniu szkodliwym warunkom środowiska i stresowi oksydacyjnemu i dzięki temu jest pośrednio zaangażowany w powstawanie jamy blastocysty i aktywację Cdx2. Zatem można przypuszczać, że podobny mechanizm może występować również w przedimplantacyjnych zarodkach królika hodowanych *in vitro*, jednak aby to potwierdzić konieczne są dalsze badania.

W komórkach TE zarodków króliczych hodowanych *in vitro* w przeciwieństwie do komórek TE zarodków rozwijających się *in vivo* brak jest wtrętów krystalicznych (CIB ang. *Crystalline Inclusions Bodies*), co również może wpływać na nieprawidłowości w różnicowaniu obserwowane w trofektodermie ^{108,134}. CIB wykrywa się także w komórkach zarodków mysich ¹³⁵, owczych ¹³⁶ i ludzkich ¹³⁷ oraz z komórkach endometrium samic królika ¹³⁴, owiec ¹³⁸ oraz człowieka ¹³⁹. CIB zbudowane są z agregatów mikrotubul ¹⁴⁰. W zarodkach rozwijających się *in vivo* CIB lokalizują się pod błoną komórkową komórek TE. Jak wykazały badania na modelu owczym, CIB powstają dzięki galektynom wydzielanym przez komórki endometrium wpływają na rozwój i różnicowanie komórek TE ¹⁴¹. Dodatkowo wiele badań wskazuje na kluczową rolę galektyn w migracji komórek trofoblastu podczas implantacji zarodka (Farmer i wsp., 2008; Kolundžić i wsp., 2011; Bojić-Trbojević i wsp., 2016, 2019).

Do tej pory nie zbadano wpływu galektyn na powstawanie wtrętów krystalicznych w TE zarodków króliczych a tym bardziej ich wpływu na różnicowanie komórek TE, jednak może to być kolejny z potencjalnych mechanizmów mogących wyjaśnić różnice obserwowane w zarodkach rozwijających się *in vivo* i *in vitro*.

7.4 Wpływ warunków hodowli na rozwój i różnicowanie pierwszych linii komórkowych w przedimplantacyjnych zarodkach królika

Zarodki ssaków hodowane *in vitro* nie tylko znacząco różnią się od zarodków rozwijających się *in vivo*, ale także różnią się od siebie nawzajem, w zależności od warunków w jakich były hodowane. Różnice obserwowane między zarodkami występują na poziomie ekspresji genów, modyfikacji epigenetycznych, metabolizmu komórek^{109,146–150} oraz – jak pokazują wyniki niniejszej pracy – również pod względem różnicowania komórek pierwszych linii komórkowych. Wpływ różnych warunków hodowli zastosowanych w badaniach niniejszej pracy [5% i 20% stężenie tlenu, różne rodzaje dodatków białkowych, rodzaj systemu hodowli (jednoetapowy i sekwencyjny) oraz współhodowla z komórkami nabłonka jajowodu] na różnicowanie pierwszych linii komórkowych w zarodkach królika nie był do tej pory badany.

Poziom stężenia tlenu

Bruzdający zarodek potrzebuje tlenu jako substratu do produkcji ATP na ścieżce fosforylacji oksydacyjnej (OXPHOS), jednak zapotrzebowanie na tlen na wczesnych etapach rozwoju jest niewielkie, gdyż zarodek praktycznie nie zwiększa na tym etapie swojej masy¹⁵¹. W stadium blastocysty, kiedy dochodzi do wyodrębnienia trofektodermi i wężła zarodkowego, zmienia się metabolizm zarodka. W komórkach ICM dominującą ścieżką pozyskiwania energii staje się glikoliza¹⁵², natomiast w komórkach TE zwiększa się aktywność OXPHOS, wzrasta zapotrzebowanie na energię w postaci ATP, a co za tym idzie również zapotrzebowanie zarodka na tlen^{153,154}. Zwiększona aktywność OXPHOS niesie ze sobą zwiększoną produkcję reaktywnych form tlenu. Komórki zarodka do pewnego stopnia potrafią regulować produkcję energii i RTF aby utrzymać homeostazę¹⁵⁵. Zachwianie homeostazy może skutkować zwiększeniem stresu oksydacyjnego, zmianami potencjału redox oraz nieprawidłowościami w biosyntezie związków, co w ostateczności może doprowadzić do obumarcia komórek zarodka^{156–160}.

Hodowla w 5% stężeniu tlenu określana jest mianem hipoksyjnej (w stosunku do stężenia atmosferycznego – ~21%) lub fizjologicznej, ponieważ stężenie tlenu w jajowodzie samic ssaków wynosi 5-8,7%, natomiast w macicy: 1,5-5%^{161–163}. W wielu badaniach podkreśla się, że obniżone ($\leq 5\%$) w stosunku do atmosferycznego stężenie tlenu poprawia rozwój zarodków w hodowli *in vitro*^{64,146,164–167}. Otrzymane w niniejszej pracy wyniki to potwierdzają i pokazują, że hodowla przedimplantacyjnych

zarodków króliczych w 5% stężeniu tlenu nie wpływa na odsetek zarodków osiągających stadium blastocysty oraz na odsetek wykluc, natomiast prowadzi do zwiększenia liczby komórek w otrzymanych zarodkach. Wyniki te są zgodne ze wcześniejszymi badaniami na zarodkach króliczych, w których wykazano, że w porównaniu z hodowlą w 21% stężeniu tlenu, hodowla zarodków od stadium moruli do blastocysty w obniżonym stężeniu tlenu (1% i 5%) nie zwiększyła odsetka uzyskanych blastocysty, jednak wpłynęła korzystnie na ich morfologię i zwiększyła liczbę komórek blastocysty¹⁶⁸. Korzystny wpływ 5% stężenia tlenu w hodowli *in vitro* na proliferację komórek związany jest z obniżeniem produkcji RFT^{156,169}. W badaniach na liniach komórkowych embrionalno-rakowych ECa 247 stwierdzono, że zwiększony stres oksydacyjny w wyniku podniesienia poziomu RFT, powoduje nieodwracalne zniszczenia DNA i prowadzi do zwiększenia częstotliwości apoptozy¹⁷⁰. Potwierdzeniem negatywnego wpływu RFT na komórki zarodków jest to, że po dodaniu do pożywek antyoksydantów zmniejszających stres oksydacyjny również obserwuje się zwiększenie liczby komórek w rozwijających się *in vitro* zarodkach gatunków takich jak mysz¹⁷¹⁻¹⁷³, szczur¹⁷⁴, bydło^{175,176} oraz królik¹⁷⁷.

Wyniki uzyskane w niniejszej pracy po raz pierwszy pokazują, że hodowla przedimplantacyjnych zarodków królika w 5% stężeniu O₂, w porównaniu z hodowlą w 21% stężeniu O₂, wpływa także na zwiększenie liczby komórek wykazujących obecność czynników transkrypcyjnych i zarazem markerów każdej z linii zarodkowych: epiblastu (SOX2), endodermy pierwotnej (SOX17) oraz trofektodermy (CDX2). Być może związane jest to obecnością w komórkach zarodków (i innych komórkach ssaczych), białek z rodziny czynników indukowanych hipoksją – HIF (ang. *hipoxia inducible factor*)^{178,179}. Czynniki HIF są częścią mechanizmu odpowiedzi komórki na stężenie tlenu w środowisku i pełnią one rolę czynników transkrypcyjnych. W warunkach hipoksyjnych lokalizują się w jądrze komórkowym wpływając na ekspresję genów, w tym genów pluripotencji. Wpływ stężenia tlenu w hodowli na ekspresję genów przedimplantacyjnych zarodków obserwowano na modelu mysim¹⁴⁶ i bydłęcym¹⁷⁸.

Nie ma jak do tej pory, żadnych informacji dotyczących wpływu poziomu stężenia tlenu na różnicowanie komórek zarodkowych i obecność czynników transkrypcyjnych Sox2, Sox17 oraz Cdx2 w zarodkach ssaków hodowanych *in vitro*. Wpływ ten zaobserwowano jednak w badaniach z wykorzystaniem ludzkich zarodkowych komórek macierzystych (hESC). Zauważono, że hodowla w 21% stężeniu tlenu skutkuje zmniejszoną syntezą i zaburzoną lokalizacją białek HIF, co prowadziło do obniżenia ekspresji genów pluripotencji w tym markera epiblastu: Sox2, w porównaniu z hodowlą w warunkach hipoksyjnych^{180,181}. Ponadto w badaniach z wykorzystaniem kul zarodkowych (*embryoid bodies*) powstałych z ludzkich ICM oraz linii komórkowych hESC H1 i H9 zauważono zwiększoną ekspresję genów związanych z różnicowaniem w kierunku endodermy pierwotnej, w tym Sox17, przy hodowli *in vitro* w warunkach ściśle hipoksyjnych: 3% O₂¹⁸² i 1,5% O₂¹⁸³. Brak jest danych potwierdzających wpływ warunków hipoksyjnych na ekspresję genu *Cdx2* oraz syntezę białka CDX2,

jednak istnieją badania dowodzące, że hipoksja jest niezbędna do różnicowania komórek trofoblastu w zarodkach świni¹⁸⁴ i myszy¹⁸⁵.

Prawdopodobnie wpływ hipoksji na różnicowanie komórek w kierunku markerów charakterystycznych dla linii EPI oraz PrE związany jest także z glikolizą, która jest ścieżką metaboliczną dominującą w komórkach ICM. Hipotezę tę potwierdza fakt, że w zarodkach mysich¹⁸⁶ oraz w ludzkich kulach zarodkowych¹⁸² hipoksja zwiększa syntezę białek z rodziny HIF oraz wpływa na zwiększenie ekspresji genu *SLC2A1* kodującego białka transportera glukozy z rodziny GLUT: GLUT1. Dodatkowo hipoksja stymuluje syntezę czynników HIF, co z kolei wpływa na zwiększenie syntezy enzymów wykorzystywanych na drodze glikolizy, zwiększając tym samym jej aktywność. Ponadto białko HIF-1 zwiększa ekspresję kinazy 1 dehydrogenazy pirogronianowej (PDK), która wpływa na inhibicję dehydrogenazy pirogronianowej (PDH), kierującej pirogronian do cyklu kwasów trójkarboksylowych¹⁸⁷. W wyniku inhibicji PDH w komórkach ICM wyciszana jest aktywność OXPHOS i zwiększana aktywność glikolizy. W zarodkach króliczych obecność i rodzaj białek HIF nie została jeszcze zbadana zatem badania dotyczące roli i aktywności białek HIF w zarodkach królika mogłyby w pełniejszym stopniu wyjaśnić korzystny wpływ hodowli w 5% stężeniu tlenu na ich rozwój i różnicowanie pierwszych linii komórkowych.

Dodatki białkowe

Wyniki uzyskane w niniejszej pracy nie wskazują jednoznacznie czy dodanie do pożywki białek w formie BSA, HSA, FBS lub KSR jest wymagane i czy korzystnie wpływa na rozwój oraz różnicowanie pierwszych linii komórkowych zarodków króliczych od stadium zygoty do stadium blastocysty 5.0 lub 6.0 *dpc*. Wydaje się, że odpowiedź na pytanie czy określony dodatek białkowy wpływa korzystnie lub niekorzystnie na rozwój zarodków, uzależniona jest od pozostałych warunków hodowli takich jak stężenie tlenu czy rodzaj zastosowanej pożywki. Uzyskane w niniejszej pracy wyniki wskazują, że w przypadku hodowli w warunkach hipoksyjnych użycie BSA i FBS nie wpływa, a niekiedy pogarsza rozwój zarodków króliczych pod względem ogólnej liczby komórek i różnicowania na poszczególne linie komórkowe. W przypadku KSR widoczny jest korzystny wpływ na różnicowanie jedynie komórek CDX2+. Natomiast zastosowanie w warunkach hodowli 21% stężenia tlenu oraz dodanie FBS lub KSR, powoduje zwiększenie ogólnej liczby komórek oraz liczby komórek CDX2+. Oznacza to, że dodatek KSR najkorzystniej wpływa na różnicowanie komórek TE, niezależnie od użytego stężenia tlenu, nie wpływając tym samym na zwiększenie liczby komórek pozostałych linii. Podobny efekt zauważono w badaniach z wykorzystaniem zarodków bydłeczych, w których hodowla w pożywce z dodatkiem KSR zwiększyła odsetek blastocyst, ich wykluc oraz liczbę komórek TE, jednocześnie nie wpływając na liczbę komórek ICM¹⁸⁸. W badaniach niniejszej pracy zauważono także, że dodanie KSR do pożywki wydłuża czas potrzebny do osiągnięcia kawitacji oraz wyklucia się zarodka, w porównaniu z pożywką

niesuplementowaną, a jak wykazała analiza morfokinetyki zarodków króliczych, istnieje pozytywna korelacja między liczbą komórek CDX2+ a czasem, który musi upłynąć aby zarodek osiągnął poszczególne stadia rozwojowe. Pozytywny wpływ FBS i KSR na ogólną liczbę komórek zarodka i liczbę komórek TE można tłumaczyć antyoksydacyjnym wpływem surowicy w hodowli zarodków, potwierdzonym w badaniach na zarodkach świni, w których pożywka suplementowana była FBS¹⁸⁹. Obecnie brak publikacji stwierdzającej efekt antyoksydacyjny KSR ponieważ jednak dodatek ten zawiera w swoim składzie albuminy¹⁹⁰ zatem możliwy jest ich wpływ na obniżenie stresu oksydacyjnego w komórkach zarodków hodowanych *in vitro*⁷⁵. Nie znając dokładnego składu i stężenia składników KSR trudno określić, który z nich mógł wpłynąć na zwiększenie liczby komórek CDX2+ oraz wydłużenie czasu, który musi upłynąć od kawitacji do wyklucia się zarodka na etapie blastocysty, w porównaniu z hodowlą z FBS oraz pożywką bez dodatków białkowych. Być może kluczowym składnikiem KSR dodawanym do przez producenta jest AlbuMAX, czyli albuminy wysokonasycone w kwasy tłuszczowe¹⁹⁰. Kwasy tłuszczowe służą jako substrat w ścieżce β -oksydacji. Funkcją tego szlaku jest między innymi produkcja zredukowanej formy dinukleotydu nikotynoamidoadeninowego (NADPH)³². Jak wykazano w badaniach prowadzonych z wykorzystaniem zarodków mysich, wzrost aktywność szlaku β -oksydacyjnego, obserwowano od stadium 8-komórkowego do blastocysty^{191,192}. Ponadto badania na zarodkach mysich prowadzone z wykorzystaniem inhibitorów wykazały, że szlak β -oksydacyjny może być jednym ze źródeł energii niezbędnej do tworzenia jamy blastocysty^{29,83}. Zatem ze względu na wyraźnie korzystny wpływ KSR na zwiększenie liczby komórek TE, warto rozważyć dalsze badania z użyciem tego suplementu.

Wyniki badań na zarodkach innych gatunków niż królik również nie dają jednoznacznych odpowiedzi na pytania o wpływ surowicy na rozwój zarodków. Dodatek FBS do hodowli zarodków od stadium moruli zwiększa odsetek uzyskanych blastocyst, ogólną liczbę komórek blastocysty oraz przyspiesza tempo podziałów komórkowych w zarodkach szczurzych¹⁹³, jelenich¹⁹⁴, bydłych¹⁹⁵ czy świńskich^{189,196}. Natomiast jeśli hodowla zarodków prowadzona była w pożywce z dodatkiem FBS od stadium zygoty, surowica wpływała hamująco na rozwój zarodków szczurzych¹⁹³ i zmniejszała odsetek uzyskanych kocich blastocyst¹⁹⁷, w porównaniu z hodowlą w pożywce bez FBS. Stwierdzono także, że FBS może wpływać na zmniejszenie liczby komórek TE oraz nieprawidłowości w budowie łożyska w zarodkach mysich^{198,199}. Badania na zarodkach mysich wykazały również że istnieją różnice pomiędzy zachowaniem zwierząt, których rozwój przedimplantacyjny zachodził *in vitro* w pożywce suplementowanej surowicą i niesuplementowanej, co wskazuje na długotrwały efekt użycia surowicy w hodowli²⁰⁰. Suplementacja pożywki FBS powoduje także występowanie syndromu dużego potomstwa (LOS, ang. *large offspring syndrome*) u owiec i bydła²⁰¹. Niejednoznaczne wyniki badań z użyciem FBS mogą wynikać między innymi z tego, że partie surowicy otrzymywane są z krwi różnych cieląt przez co różnią się między sobą składem, w tym rodzajem i stężeniem czynników wzrostu^{164,202,203}

Wcześniejsze badania na zarodkach króliczych wskazują na pozytywny wpływ suplementacji pożywki albuminami w porównaniu z pożywką niesuplementowaną. Dodanie BSA do pożywki zwiększało odsetek uzyskiwanych blastocyst oraz liczby komórek w blastocystach^{1,52,204}. W przypadku badań przeprowadzonych w ramach niniejszej pracy, w których pożywka suplementowana była BSA lub HSA, trudno o jednoznaczną ocenę wpływu suplementacji na różnicowanie pierwszych linii komórkowych w zarodkach królika. Zauważono jednak, że porównując rozwój zarodków królika w pożywkach z dodatkiem BSA lub HSA z rozwojem zarodków w pożywkach niesuplementowanych, suplement białkowy znacząco zmniejszał liczbę komórek SOX2+.

Pożywki komercyjne

Szacuje się, że światowy rynek związany z technologią wspomaganego rozrodu w 2018 roku wart był 23,6 miliardów dolarów a do 2027 roku, wartość ta osiągnie poziom 37,6 miliardów dolarów (Global Assisted Reproductive Technology Market to Surpass US\$ 37.6 Billion by 2027 - Coherent Market Insights, 2019). Silnie rozwija się też sektor produkujący komercyjne pożywki do hodowli ludzkich zarodków. W klinikach wspomaganego rozrodu używa się pożywek dedykowanych do dwóch systemów hodowli: sekwencyjnego lub jednoetapowego. Pożywki sekwencyjne w teorii próbują naśladować *in vitro* warunki fizjologiczne. Założeniem systemu hodowli sekwencyjnej jest hodowla zarodka od stadium zygoty do moruli w pożywce o kompozycji składników bazującej na składzie płynu jajowodowego a następnie przeniesienie zarodka i hodowlę w pożywce o składzie przypominającym skład płynu macicznego. Pożywki wspomagające rozwój od zygoty do moruli i od moruli do blastocysty różnią się zazwyczaj składem aminokwasów oraz stężeniem glukozy^{206,207}. Natomiast system jednoetapowy zakłada hodowlę w pożywce o składzie zawierającym wszystkie niezbędne składniki umożliwiające nieprzerwany rozwój od zygoty do blastocysty. Systemy jednoetapowe wykorzystuje się z powodzeniem do hodowli zarodków myszy^{208,209}, bydła^{210,211}, świni²¹²⁻²¹⁴, człowieka^{215,216} czy królika^{1,11}. Natomiast pierwszy system sekwencyjny został zaproponowany przez Gardnera i Lane do hodowli zarodków myszy²¹⁷ i z powodzeniem wykorzystywany jest do hodowli zarodków ludzkich^{206,218}, makaków²¹⁹, bydła²²⁰, świni²²¹ oraz królika¹⁰⁹. Obydwa podejścia do IVC mają swoje wady i zalety. Jedną z zalet hodowli w systemie sekwencyjnym jest to, że poprzez zmianę pożywki w trakcie hodowli usuwa się produkty przemiany materii produkowane przez metabolizujące komórki zarodka, m.in. szkodliwy amoniak⁵³. System sekwencyjny uwzględnia także zmieniające się wymagania metaboliczne zarodka na etapie bruzdkowania oraz na etapie blastocysty²²². Z drugiej strony w systemie jednoetapowym, zarodek otrzymuje substraty niezbędne do rozwoju od zygoty do blastocysty²²³ i nie naraża się go na nagłe zmiany warunków hodowli i ekspozycję na światło, tak jak się to dzieje w systemie sekwencyjnym przy przenoszeniu zarodka z jednej pożywki do drugiej^{224,225}. Zatem wybór

odpowiedniego systemu hodowli nie jest prosty i wciąż potrzebne są badania, mogące pomóc w odpowiedzi na pytanie, który z systemów jest bardziej optymalny dla rozwoju zarodków ssaczy.

Zarodki królicze, w porównaniu z zarodkami gryzoni, cechują się pod wieloma względami większym podobieństwem do zarodków innych ssaków, w tym naczelnych^{12-14,16-18}. Z tego powodu coraz częściej wykorzystuje się zarodki królicze jako model w badaniach dotyczących wpływu czynników warunkujących rozwój zarodków ludzkich, m.in. składu pożywek używanych w klinikach *in vitro*¹⁰⁹ czy chorób cywilizacyjnych, np. cukrzycy ciężarnych²²⁶⁻²³⁰. Zatem wykonane w tej pracy badania dotyczące wpływu pożywek komercyjnych na rozwój i różnicowanie pierwszych linii komórkowych w zarodkach królika nie tylko pozwalają określić wymagania hodowlane zarodków króliczych, ale też stanowią podstawę do dyskusji, czy zarodki królicze są dobrym modelem do badań nad optymalizacją warunków hodowli *in vitro* dla zarodków ludzkich.

Wyniki uzyskane w niniejszej pracy wskazują na to, że hodowla zarodków króliczych w pożywkach komercyjnych nie wpływa korzystnie na różnicowanie linii komórkowych przedimplantacyjnych zarodków. Zauważono także, że w dwóch z trzech użytych w badaniach pożywek sekwencyjnych rozwój zarodków królika był silnie zaburzony. W pożywkach: G-1™/G-2™ (G1/G2) oraz Quinn's Advantage™ Cleavage Medium/Quinn's Advantage™ Blastocyst Medium (QASM) mniej niż 50% hodowanych zarodków osiągnęło stadium blastocysty, w porównaniu z hodowlą w pożywce RDH z odnowieniem, w której ponad 85% zarodków osiągnęło stadium blastocysty. Możliwym wytłumaczeniem tego zjawiska jest fakt, że pożywki G1/G2 oraz QASM dedykowane do hodowli zarodków od stadium zygoty do moruli nie mają w swoim składzie aminokwasów egzogennych (EAA). Natomiast w jajowodzie samic królika obecne są oba typy aminokwasów EAA oraz NEAA²³¹. Brak EAA w pożywkach stosowanych do hodowli *in vitro* na wczesnych etapach rozwoju zarodków królika, mógł wpłynąć na zmniejszenie odsetka zarodków osiagających stadium blastocysty. Do podobnych wniosków doszły też inne grupy badawcze badające wpływ aminokwasów na modelu króliczym oraz mysim²³²⁻²³⁴. W badaniach na modelu mysim udowodniono, że aminokwasy mogą pełnić rolę substratu do produkcji energii poprzez OXPHOS zatem dodatek pełnego zestawu aminokwasów (NEAA i EAA) w hodowli zarodków od stadium zygoty, wpływa na zwiększenie odsetka zarodków osiagających stadium blastocysty oraz liczby komórek zarodka w tym komórek ICM oraz TE^{232,233,235-237}. Natomiast brak aminokwasów w pożywce powoduje zaburzenia w metabolizmie zarodka, m.in. obserwuje się niefizjologiczną, zwiększoną produkcję energii poprzez glikolizę i obniżoną aktywność OXPHOS²³⁸⁻²⁴⁰.

Wpływ pożywek sekwencyjnych i jednoetapowych dedykowanych i wykorzystywanych w klinikach wspomaganego rozrodu był i jest przedmiotem wielu badań, jednak podobnie jak w niniejszej pracy, konsensus dotyczący wyboru systemu, który korzystniej wpływa na rozwój zarodków nie został uzyskany. Podobne wnioski wysnuto na podstawie badań dotyczących modyfikacji epigenetycznych w przedimplantacyjnych zarodkach królika hodowanych w pożywkach sekwencyjnych i jednoetapowych

¹⁰⁹. Z badań tych wynika, że istnieją istotne różnice w profilu metylacji i hydroksymetylacji DNA pomiędzy zarodkami hodowanymi w pożywce sekwencyjnej G-1™ PLUS/G-2™ PLUS (G1/G2+, 5% HSA) i jednoetapowej Global® (Global+, 10% HSA). Stwierdzono jednak, że żadna z zastosowanych pożywek, nie umożliwiła zarodkom uzyskania profilu metylacji podobnego do obserwowanego *in vivo* zatem trudno ocenić, który system stwarza bardziej korzystne warunki dla rozwoju zarodków. W badaniach na modelu mysim porównujących efektywność hodowli zarodków od zygoty do blastocysty, w pożywce jednoetapowej z odnowieniem (pożywka KSOM+, odnowienie w 3 dniu hodowli) z hodowlą w pożywce sekwencyjnej (G1/G2+), stwierdzono zarówno większy odsetek blastocysty i wyklutych blastocyst, jak również większą liczbę komórek ICM w blastocystach powstałych w systemie jednoetapowym ²⁴¹. Badania innych autorów przedstawiają jednak przeciwstawne wyniki, iż hodowla mysich zarodków w pożywce sekwencyjnej G1/G2+ pozwoliła na uzyskanie większego odsetka blastocyst po 117 godzinach hodowli, w porównaniu z pożywką jednoetapową KSOM ²⁴². W przytaczanych badaniach zarodki hodowano ok. 120 godzin, jednak używano myszy różnych szczepów, co mogło wpłynąć na uzyskanie przeciwstawnych wyników ²⁴³. Badania nad hodowlą *in vitro* zarodków ludzkich również nie dają jednoznacznej odpowiedzi, który z systemów jest najkorzystniejszy dla ich rozwoju. Zarówno w badaniu z użyciem ślepej próby jak i metaanalizie, nie wykazano różnic istotnych statystycznie w jakości zarodków ²⁴⁴ oraz w liczbie poronień i liczbie utrzymanych ciąży uzyskanych po transferze ludzkich zarodków, hodowanych z wykorzystaniem obu systemów ²⁴⁵.

Stworzenie idealnych warunków hodowli *in vitro* dla zarodków ssaków jest bardzo trudne, gdyż należy uwzględnić wiele czynników wpływających na zarodek w hodowli. Wybór pomiędzy systemem jednoetapowym a sekwencyjnym wiąże się z przyjęciem pewnych kompromisów, gdyż uwzględnienie jednego czynnika (np. zmieniające się wymagania zarodków przechodzących z etapu brudzkowania do etapu blastocysty), wyklucza uwzględnienie drugiego (utrzymanie niezmiennych warunków hodowli takich jak pH, temperatura). Dodatkowo zarodki różnych gatunków ssaków, mimo że pod wieloma względami są do siebie podobne (np. zarodki królika i człowieka), cechują się odmiennymi wymaganiami na substraty energetyczne i budulcowe (np. aminokwasy). Zatem, co potwierdzają wyniki uzyskane w niniejszej pracy, królik nie jest odpowiednim modelem do badań porównujących rozwój zarodków w pożywkach komercyjnych, jednoetapowych i sekwencyjnych, gdyż dedykowane do hodowli ludzkich zarodków pożywki niekorzystnie wpływają na rozwój zarodków króliczych i różnicowanie w nich pierwszych linii komórkowych.

Wspólhodowla z komórkami somatycznymi

Wykorzystując technikę współhodowli (ang. *co-culture*) zakłada się naśladowanie fizjologicznych warunków rozwoju, poprzez hodowlę zarodków w obecności komórek somatycznych. Często są to komórki, z którymi zarodek ma kontakt w drogach rodnych samicy, takie jak komórki

nabłonkowe jajowodu (OEC) lub macicy (UEC). Wyniki badań wskazują, że komórki somatyczne w hodowli *in vitro* mogą wspierać rozwój zarodków dzięki wydzielanym parakrynnie substancjom odżywczym^{246–249} i czynnikom wzrostu^{250–252}. Substancje wydzielane przez komórki somatyczne mogą wpływać na redukcję czynników toksycznych^{253,254}, stanowić ochronę przed stresem oksydacyjnym^{255–257} oraz mogą modulować właściwości fizykochemiczne pożywki^{258,259}. W rozwoju zarodkowym *in vitro* wykorzystanie technik współhodowli umożliwiło przezwycięzenie bloku rozwojowego w stadium 2-komórkowym u myszy²⁶⁰ oraz u bydła²⁶¹, a także pomogło zwiększyć odsetek zarodków osiągających stadium blastocysty^{262,263}. Współhodowlę zarodków z komórkami somatycznymi z powodzeniem wykorzystywano także do hodowli ludzkich zarodków od stadium zygoty do blastocysty^{264–266}.

Wpływ współhodowli na rozwój przedimplantacyjnych zarodków królika badano zwykle wykorzystując królicze komórki nabłonka jajowodu (ROEC), jednak wyniki tych badań nie pozwalają na wyciągnięcie jednoznacznych wniosków dotyczących wpływu ROEC na rozwój króliczych zarodków. W jednym z badań z wykorzystaniem warstwy komórek ROEC zauważono, że hodowla zarodków króliczych z ROEC wpływa na przyspieszenie tempa podziałów komórkowych¹¹. Zarodki hodowane z ROEC wykazywały średnio o 2 godziny krótszy cykl komórkowy i po takim samym czasie hodowli miały znacząco więcej komórek, niż te hodowane bez ROEC. Inni autorzy wykazali, że warstwa ROEC może istotnie zwiększać liczbę komórek zarodków królika, hodowanych *in vitro* przez 65 godzin, pod warunkiem, że warstwa ta została założona wcześniej i była ustabilizowana i konfluentna²⁶⁷. Wykazano również, że rodzaj pożywki ma większe znaczenie niż sama współhodowla, gdyż dodanie ROEC do pożywek Ham's F10 i CZB nie zwiększało odsetka blastocyst, w porównaniu z hodowlą bez ROEC. Uzyskano także znacząco więcej zarodków, które rozwinęły się do stadium blastocysty w pożywce Medium199 z ROEC, jednak obecność ROEC w tej pożywce nie wpłynęła znacząco na liczbę komórek zarodka, w porównaniu z hodowlą w tej samej pożywce bez ROEC. Ci sami autorzy, porównywali również wpływ współhodowli zarodków króliczych i bydlęcych, hodowanych na warstwie z różnych typów somatycznych komórek króliczych¹⁰. Wyniki tych doświadczeń wykazały, że nie ma różnic między odsetkami uzyskanych i wyklutych blastocyst, niezależnie od tego czy zarodki królicze hodowane były prowadzone w czy bez współhodowli. Zauważono jednak znaczący, pozytywny wpływ współhodowli na rozwój bydlęcych zarodków. Zatem możliwe są dwa wytłumaczenia uzyskanych wyników: (A) zarodki królicze nie odbierają sygnałów od komórek somatycznych we współhodowli lub (B) komórki somatyczne nie wydzielają substancji, które mogłyby zostać wykorzystane przez zarodki królika.

Dodatkowo zauważono, że czynnikiem, który mógł wpłynąć na rozwój zarodków króliczych w hodowli z ROEC jest niemal ciągłe przemieszczanie się zarodka w kropli, gdyż zarodki we współhodowli były stale poruszane przez rzęski urzęsionych komórek nabłonkowych. Stwierdzono że, ruch zarodka

w kropli i ruch pożywki poprawia rozwój mysich i ludzkich zarodków *in vitro*^{268–270}. Wyniki niniejszej pracy pokazują jednak, że być może w przypadku zarodków królika przemieszczanie się zarodka w kropli pożywki bądź nie wpływa na różnicowanie komórek w zarodkach królika, bądź też – w niektórych przypadkach – obniża nawet stopień ich zróżnicowania.

Uzyskane w niniejszej pracy wyniki wskazują, że współhodowla przedimplantacyjnych króliczych zarodków z pęcherzykami z komórek nabłonkowych jajowodu królika (ROEC), nie jest odpowiednią techniką hodowli *in vitro* dla króliczych zarodków.

8. Wnioski

- Obecnie stosowane warunki hodowli *in vitro* zarodków królika nie są warunkami optymalnymi, zapewniającymi prawidłowy rozwój przedimplantacyjny.
- Warunki hodowli zarodków króliczych *in vitro* wpływają zarówno na morfokinetykę, ogólną liczbę komórek, jak i na procesy różnicowania pierwszych linii komórkowych, zaburzając czas powstawania i wzór lokalizacji czynników transkrypcyjnych związanych z różnicowaniem tych linii.
- Hodowla *in vitro* w zbliżonym do fizjologicznego stężeniu tlenu ma najsilniejszy wpływ na poprawę jakości i różnicowanie pierwszych linii komórkowych zarodków królika, jednak rozwój ten nie jest równoważny z obserwowanym *in vivo*.
- Komercyjnie dostępne pożywki do hodowli zarodków w systemie sekwencyjnym oraz jednoetapowym nie zapewniają optymalnych warunków dla rozwoju zarodków królika.
- Zastosowanie komercyjnych pożywek do hodowli zarodków w systemie sekwencyjnym oraz jednoetapowym stwarza mniej korzystne warunki do rozwoju zarodków króliczych w porównaniu do hodowli w standardowej w niekomercyjnej pożywce RDH.
- Aktywność szlaków metabolicznych w zarodkach króliczych jest skorelowana z etapem rozwoju zarodkowego.

9. Piśmiennictwo

1. Jin, D. I., Kim, D. K., Im, K. S. & Choi, W. S. Successful pregnancy after transfer of rabbit blastocysts grown *in vitro* from single-cell zygotes. *Theriogenology* **54**, 1109–1116 (2000).
2. Kane, M. T. & Buckley, N. J. The effects of inhibitors of energy metabolism on the growth of one-cell rabbit ova to blastocysts *in vitro*. *J. Reprod. Fertil.* **49**, 261–266 (1977).
3. Downs, S. M., Humpherson, P. G. & Leese, H. J. Meiotic induction in cumulus cell-enclosed mouse oocytes: involvement of the pentose phosphate pathway. *Biol. Reprod.* **58**, 1084–1094 (1998).
4. Riganti, C. *et al.* Diphenyleneiodonium Inhibits the Cell Redox Metabolism and Induces Oxidative Stress. *J. Biol. Chem.* **279**, 47726–47731 (2004).

5. Lange, K. & Proft, E. R. Inhibition of the 6-phosphogluconate dehydrogenase in the rat kidney by 6-aminonicotinamide. *Naunyn. Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* **267**, 177–180 (1970).
6. Tyson, R. L., Perron, J. & Sutherland, G. R. 6-Aminonicotinamide inhibition of the pentose phosphate pathway in rat neocortex. *Neuroreport* **11**, 1845–1848 (2000).
7. Chi, F., Sharpley, M. S., Nagaraj, R., Roy, S. S. & Banerjee, U. Glycolysis-Independent Glucose Metabolism Distinguishes TE from ICM Fate during Mammalian Embryogenesis. *Dev. Cell* **53**, 9-26.e4 (2020).
8. Carney, E. W. & Foote, R. Improved development of rabbit one-cell embryos to the hatching blastocyst stage by culture in a defined, protein-free culture medium. *J. Reprod. Fertil.* (1991) doi:10.1530/jrf.0.0910113.
9. Yan, Z. *et al.* Eight-Shaped Hatching Increases the Risk of Inner Cell Mass Splitting in Extended Mouse Embryo Culture. in *PloS one* (2015). doi:10.1371/journal.pone.0145172.
10. Carney, E. W., Tobback, C., Ellington, J. E. & Foote, R. H. Co-culture of rabbit 2-Cell embryos with rabbit oviduct epithelial cells and other somatic cells. *Mol. Reprod. Dev.* **27**, 209–215 (1990).
11. Carney, E. W. & Foote, R. H. Effects of superovulation, embryo recovery, culture system and embryo transfer on development of rabbit embryos in vivo and in vitro. *J. Reprod. Fertil.* **89**, 543–551 (1990).
12. Graur, D., Duret, L. & Gouy, M. Phylogenetic position of the order Lagomorpha (rabbits, hares and allies). *Nature* **379**, 333–335 (1996).
13. Fan, J. & Watanabe, T. Transgenic rabbits as therapeutic protein bioreactors and human disease models. *Pharmacol. Ther.* **99**, 261–282 (2003).
14. Honda, A. *et al.* Stable embryonic stem cell lines in rabbits: potential small animal models for human research. *Reprod. Biomed. Online* **17**, 706–715 (2008).
15. Bosze Zs. & Houdebine L.M. Application of rabbits in biomedical research: a review. *World Rabbit Sci.* **14**, 01–14 (2010).
16. Okamoto, I. *et al.* Eutherian mammals use diverse strategies to initiate X-chromosome inactivation during development. *Nature* **472**, 370–374 (2011).
17. Fischer, B., Chavatte-Palmer, P., Viebahn, C., Navarrete Santos, A. & Duranthon, V. Rabbit as a reproductive model for human health. *REPRODUCTION* **144**, 1–10 (2012).
18. Piliszek, A., Madeja, Z. E. & Plusa, B. Suppression of ERK signalling abolishes primitive endoderm formation but does not promote pluripotency in rabbit embryo. *Development* **144**, 3719–3730 (2017).
19. Biggers, J. D., Whittingham, D. G. & Donahue, R. P. The pattern of energy metabolism in the mouse oöcyte and zygote. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **58**, 560–567 (1967).
20. Leese, H. J., Conaghan, J., Martin, K. L. & Hardy, K. Early human embryo metabolism. *BioEssays News Rev. Mol. Cell. Dev. Biol.* **15**, 259–264 (1993).
21. Houghton, F. D., Thompson, J. G., Kennedy, C. J. & Leese, H. J. Oxygen consumption and energy metabolism of the early mouse embryo. *Mol. Reprod. Dev.* **44**, 476–485 (1996).
22. Gopichandran, N. & Leese, H. J. Metabolic characterization of the bovine blastocyst, inner cell mass, trophectoderm and blastocoel fluid. *Reprod. Camb. Engl.* **126**, 299–308 (2003).
23. Sturmey, R. G. & Leese, H. J. Energy metabolism in pig oocytes and early embryos. *Reprod. Camb. Engl.* **126**, 197–204 (2003).
24. Fridhandler, L., Hafez, E. S. & Pincus, G. Developmental changes in the respiratory activity of rabbit ova. *Exp. Cell Res.* **13**, 132–139 (1957).
25. Fridhandler, L. Pathways of glucose metabolism in fertilized rabbit ova at various pre-implantation stages. *Exp. Cell Res.* **22**, 303–316 (1961).
26. Wales, R. G. & Du, Z. F. Contribution of the pentose phosphate pathway to glucose utilization by preimplantation sheep embryos. *Reprod. Fertil. Dev.* **5**, 329–340 (1993).
27. O’Fallon, J. V. & Wright, R. W. Quantitative determination of the pentose phosphate pathway in preimplantation mouse embryos. *Biol. Reprod.* **34**, 58–64 (1986).

28. Javed, M. H. & Wright, R. W. Determination of pentose phosphate and Embden-Meyerhof pathway activities in bovine embryos. *Theriogenology* **35**, 1029–1037 (1991).
29. Dunning, K. R. *et al.* Beta-Oxidation Is Essential for Mouse Oocyte Developmental Competence and Early Embryo Development. *Biol. Reprod.* **83**, 909–918 (2010).
30. Oey, N. A. *et al.* Fatty acid oxidation in the human fetus: implications for fetal and adult disease. *J. Inherit. Metab. Dis.* **29**, 71–75 (2006).
31. Lin, Z. *et al.* Fatty acid oxidation promotes reprogramming by enhancing oxidative phosphorylation and inhibiting protein kinase C. *Stem Cell Res. Ther.* **9**, 47 (2018).
32. Hayes, J. D. & Dinkova-Kostova, A. T. The Nrf2 regulatory network provides an interface between redox and intermediary metabolism. *Trends Biochem. Sci.* **39**, 199–218 (2014).
33. Lane, M. & Gardner, D. K. Blastomere Homeostasis. in *ART and the Human Blastocyst* (eds. Gardner, D. K. & Lane, M.) 69–90 (Springer, 2001). doi:10.1007/978-1-4613-0149-3_7.
34. Dworkin, M. B. & Dworkin-Rastl, E. Carbon metabolism in early amphibian embryos. *Trends Biochem. Sci.* **16**, 229–234 (1991).
35. Houghton, F. D., Thompson, J. G., Kennedy, C. J. & Leese, H. J. Oxygen consumption and energy metabolism of the early mouse embryo. *Mol. Reprod. Dev.* **44**, 476–485 (1996).
36. Leese, H. J. Quiet please, do not disturb: a hypothesis of embryo metabolism and viability. *BioEssays* **24**, 845–849 (2002).
37. Leese, H. J., Baumann, C. G., Brison, D. R., McEvoy, T. G. & Sturmey, R. G. Metabolism of the viable mammalian embryo: quietness revisited. *Mol. Hum. Reprod.* **14**, 667–672 (2008).
38. Hewitson, L. C. & Leese, H. J. Energy metabolism of the trophectoderm and inner cell mass of the mouse blastocyst. *J. Exp. Zool.* **267**, 337–343 (1993).
39. Houghton, F. D. Energy metabolism of the inner cell mass and trophectoderm of the mouse blastocyst. *Differentiation* **74**, 11–18 (2006).
40. Jang, H., Yang, J., Lee, E. & Cheong, J.-H. Metabolism in embryonic and cancer stemness. *Arch. Pharm. Res.* **38**, 381–388 (2015).
41. Heiden, M. G. V., Cantley, L. C. & Thompson, C. B. Understanding the Warburg Effect: The Metabolic Requirements of Cell Proliferation. *Science* **324**, 1029–1033 (2009).
42. Hewitson, L. C. & Leese, H. J. Energy metabolism of the trophectoderm and inner cell mass of the mouse blastocyst. *J. Exp. Zool.* **267**, 337–343 (1993).
43. Trimarchi, J. R., Liu, L., Porterfield, D. M., Smith, P. J. & Keefe, D. L. Oxidative phosphorylation-dependent and -independent oxygen consumption by individual preimplantation mouse embryos. *Biol. Reprod.* **62**, 1866–1874 (2000).
44. Houghton, F. D. Energy metabolism of the inner cell mass and trophectoderm of the mouse blastocyst. *Differ. Res. Biol. Divers.* **74**, 11–18 (2006).
45. Cagnone, G. & Sirard, M.-A. The embryonic stress response to in vitro culture: insight from genomic analysis. *Reproduction* **152**, R247–R261 (2016).
46. Magnusson, C., Hillensjö, T., Hamberger, L. & Nilsson, L. Oxygen consumption by human oocytes and blastocysts grown in vitro. *Hum. Reprod. Oxf. Engl.* **1**, 183–184 (1986).
47. Trimarchi, J. R., Liu, L., Porterfield, D. M., Smith, P. J. S. & Keefe, D. L. Oxidative Phosphorylation-Dependent and -Independent Oxygen Consumption by Individual Preimplantation Mouse Embryos. *Biol. Reprod.* **62**, 1866–1874 (2000).
48. Lopes, A. S. *et al.* Investigation of respiration of individual bovine embryos produced in vivo and in vitro and correlation with viability following transfer. *Hum. Reprod.* **22**, 558–566 (2007).
49. Leese, H. J. & Barton, A. M. Pyruvate and glucose uptake by mouse ova and preimplantation embryos. *J. Reprod. Fertil.* **72**, 9–13 (1984).
50. Gardner, D. K. & Leese, H. J. Non-invasive measurement of nutrient uptake by single cultured pre-implantation mouse embryos. *Hum. Reprod. Oxf. Engl.* **1**, 25–27 (1986).
51. Kane, M. T. Fatty acids as energy sources for culture of one-cell rabbit ova to viable morulae. *Biol. Reprod.* **20**, 323–332 (1979).
52. Kane, M. T. Minimal Nutrient Requirements for Culture of One-Cell Rabbit Embryos. *Biol. Reprod.* **37**, 775–778 (1987).

53. Gardner, D. K. & Lane, M. Amino Acids and Ammonium Regulate Mouse Embryo Development in Culture¹. *Biol. Reprod.* **48**, 377–385 (1993).
54. Rieger, D., McGowan, L. T., Cox, S. F., Pugh, P. A. & Thompson, J. G. Effect of 2,4-dinitrophenol on the energy metabolism of cattle embryos produced by in vitro fertilization and culture. *Reprod. Fertil. Dev.* **14**, 339–343 (2002).
55. Vangapandu, H. V. *et al.* Biological and metabolic effects of IACS-010759, an OxPhos inhibitor, on chronic lymphocytic leukemia cells. *Oncotarget* **9**, 24980–24991 (2018).
56. Kaneko, K. J. Metabolism of Preimplantation Embryo Development: A Bystander or an Active Participant? *Curr. Top. Dev. Biol.* **120**, 259–310 (2016).
57. Dunning, K. R., Russell, D. L. & Robker, R. L. Lipids and oocyte developmental competence: the role of fatty acids and β -oxidation. *Reproduction* **148**, R15–R27 (2014).
58. Karja, N. W. K. *et al.* Development to the blastocyst stage, the oxidative state, and the quality of early developmental stage of porcine embryos cultured in alteration of glucose concentrations in vitro under different oxygen tensions. *Reprod. Biol. Endocrinol.* **4**, 54 (2006).
59. Javed, M. H. & Wright, R. W. Determination of pentose phosphate and Embden-Meyerhof pathway activities in bovine embryos. *Theriogenology* **35**, 1029–1037 (1991).
60. O’Fallon, J. V. & Wright, R. W. Quantitative Determination of the Pentose Phosphate Pathway in Preimplantation Mouse Embryos. *Biol. Reprod.* **34**, 58–64 (1986).
61. Manes, C. & Lai, N. C. Nonmitochondrial oxygen utilization by rabbit blastocysts and surface production of superoxide radicals. *J. Reprod. Fertil.* **104**, 69–75 (1995).
62. Herrick, J. R., Brad, A. M. & Krisher, R. L. Chemical manipulation of glucose metabolism in porcine oocytes: effects on nuclear and cytoplasmic maturation in vitro. *Reproduction* **131**, 289–298 (2006).
63. Chirala, S. S. *et al.* Fatty acid synthesis is essential in embryonic development: fatty acid synthase null mutants and most of the heterozygotes die in utero. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100**, 6358–6363 (2003).
64. Harvey, A. J., Kind, K. L. & Thompson, J. G. REDOX regulation of early embryo development. *Reprod. Camb. Engl.* **123**, 479–486 (2002).
65. O’Donnell, B. V., Tew, D. G., Jones, O. T. & England, P. J. Studies on the inhibitory mechanism of iodonium compounds with special reference to neutrophil NADPH oxidase. *Biochem. J.* **290**, 41–49 (1993).
66. O’Donnell, V. B., Smith, G. C. & Jones, O. T. Involvement of phenyl radicals in iodonium inhibition of flavoenzymes. *Mol. Pharmacol.* **46**, 778–785 (1994).
67. Nasr-Esfahani, M. M. & Johnson, M. H. The origin of reactive oxygen species in mouse embryos cultured in vitro. *Dev. Camb. Engl.* **113**, 551–560 (1991).
68. Gouge, R. C., Marshburn, P., Gordon, B. E., Nunley, W. & Huet-Hudson, Y. M. Nitric oxide as a regulator of embryonic development. *Biol. Reprod.* **58**, 875–879 (1998).
69. Filosa, S. *et al.* Failure to increase glucose consumption through the pentose-phosphate pathway results in the death of glucose-6-phosphate dehydrogenase gene-deleted mouse embryonic stem cells subjected to oxidative stress. *Biochem. J.* **370**, 935–943 (2003).
70. Tranguch, S., Steuerwald, N. & Huet-Hudson, Y. M. Nitric oxide synthase production and nitric oxide regulation of preimplantation embryo development. *Biol. Reprod.* **68**, 1538–1544 (2003).
71. Li, Y. & Trush, M. A. Diphenyleneiodonium, an NAD(P)H oxidase inhibitor, also potently inhibits mitochondrial reactive oxygen species production. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **253**, 295–299 (1998).
72. Karja, N. W. K. *et al.* Addition of diphenyleneiodonium or dehydroepiandrosterone to culture media inhibits reactive oxygen species production during the early cleavage stages of in vitro-produced porcine embryos. *Reprod. Fertil. Dev.* **19**, 208–208 (2007).
73. Covarrubias, L., Hernández-García, D., Schnabel, D., Salas-Vidal, E. & Castro-Obregón, S. Function of reactive oxygen species during animal development: Passive or active? *Dev. Biol.* **320**, 1–11 (2008).

74. Sedeek, M., Nasrallah, R., Touyz, R. M. & Hébert, R. L. NADPH Oxidases, Reactive Oxygen Species, and the Kidney: Friend and Foe. *J. Am. Soc. Nephrol.* **24**, 1512–1518 (2013).
75. Roche, M., Rondeau, P., Singh, N. R., Tarnus, E. & Bourdon, E. The antioxidant properties of serum albumin. *FEBS Lett.* **582**, 1783–1787 (2008).
76. Köhler, E., Barrach, H.-J. & Neubert, D. Inhibition of NADP dependent oxidoreductases by the 6-aminonicotinamide analogue of NADP. *FEBS Lett.* **6**, 225–228 (1970).
77. Berg, J. M., Tymoczko, J. L. & Stryer, L. 20.3 the Pentose Phosphate Pathway Generates NADPH and Synthesizes Five-Carbon Sugars. *Biochem. 5th Ed.* (2002).
78. Tsujii, H., Matsuoka, Y., Obata, R., Hossain, M. S. & Takagi, Y. Fatty acid composition of lipids in day 7–13 blastocysts, serum and uterine fluid of rabbits. *Reprod. Med. Biol.* **8**, 107–112 (2009).
79. Kruszynska, Y. T., Stanley, H. & Sherratt, A. Glucose kinetics during acute and chronic treatment of rats with 2[6(4-chloro-phenoxy) hexyl]oxirane-2-carboxylate, etomoxir. *Biochem. Pharmacol.* **36**, 3917–3921 (1987).
80. Butterworth, P. J. Lehninger: principles of biochemistry (4th edn) D. L. Nelson and M. C. Cox, W. H. Freeman & Co., New York, 1119 pp (plus 17 pp glossary), ISBN 0-7167-4339-6 (2004). *Cell Biochem. Funct.* **23**, 293–294 (2005).
81. Carracedo, A., Cantley, L. C. & Pandolfi, P. P. Cancer metabolism: fatty acid oxidation in the limelight. *Nat. Rev. Cancer* **13**, 227–232 (2013).
82. Pike, L. S., Smift, A. L., Croteau, N. J., Ferrick, D. A. & Wu, M. Inhibition of fatty acid oxidation by etomoxir impairs NADPH production and increases reactive oxygen species resulting in ATP depletion and cell death in human glioblastoma cells. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Bioenerg.* **1807**, 726–734 (2011).
83. Berger, P. S. & Wood, P. A. Disrupted blastocoele formation reveals a critical developmental role for long-chain acyl-CoA dehydrogenase. *Mol. Genet. Metab.* **82**, 266–272 (2004).
84. Stern, S., Biggers, J. D. & Anderson, E. Mitochondria and early development of the mouse. *J. Exp. Zool.* **176**, 179–191 (1971).
85. Cogliati, S. *et al.* Mitochondrial Cristae Shape Determines Respiratory Chain Supercomplexes Assembly and Respiratory Efficiency. *Cell* **155**, 160–171 (2013).
86. Chazaud, C., Yamanaka, Y., Pawson, T. & Rossant, J. Early Lineage Segregation between Epiblast and Primitive Endoderm in Mouse Blastocysts through the Grb2-MAPK Pathway. *Dev. Cell* **10**, 615–624 (2006).
87. Dietrich, J.-E. & Hiiragi, T. Stochastic patterning in the mouse pre-implantation embryo. *Development* **134**, 4219–4231 (2007).
88. Plusa, B., Piliszek, A., Frankenberg, S., Artus, J. & Hadjantonakis, A.-K. Distinct sequential cell behaviours direct primitive endoderm formation in the mouse blastocyst. *Development* **135**, 3081–3091 (2008).
89. Ralston, A. & Rossant, J. Cdx2 acts downstream of cell polarization to cell-autonomously promote trophectoderm fate in the early mouse embryo. *Dev. Biol.* **313**, 614–629 (2008).
90. Jedrusik, A. *et al.* Maternally and zygotically provided Cdx2 have novel and critical roles for early development of the mouse embryo. *Dev. Biol.* **344**, 66–78 (2010).
91. Frankenberg, S. *et al.* Primitive endoderm differentiates via a three-step mechanism involving Nanog and RTK signaling. *Dev. Cell* **21**, 1005–1013 (2011).
92. Berg, D. K. *et al.* Trophectoderm Lineage Determination in Cattle. *Dev. Cell* **20**, 244–255 (2011).
93. Piliszek, A. & Madeja, Z. E. Chapter Eleven - Pre-implantation Development of Domestic Animals. in *Current Topics in Developmental Biology* (eds. Plusa, B. & Hadjantonakis, A.-K.) vol. 128 267–294 (Academic Press, 2018).
94. Harvey, A. J., Armant, D. R., Bavister, B. D., Nichols, S. M. & Brenner, C. A. Inner cell mass localization of NANOG precedes OCT3/4 in rhesus monkey blastocysts. *Stem Cells Dev.* **18**, 1451–1458 (2009).
95. Henderson, G. R. W. *et al.* Candidate gene expression patterns in rabbit preimplantation embryos developed in vivo and in vitro. *J. Assist. Reprod. Genet.* **31**, 899–911 (2014).

96. Bontovics, B. *et al.* Expression Pattern of Pluripotency Markers in Rabbit Embryoblast. *Bull. Univ. Agric. Sci. Vet. Med. Cluj-Napoca Vet. Med.* **69**, (2012).
97. Maraghechi, P. *et al.* Discovery of pluripotency-associated microRNAs in rabbit preimplantation embryos and embryonic stem-like cells. *Reproduction* **145**, 421–437 (2013).
98. Sanz, G. *et al.* Differentiation of derived rabbit trophoblast stem cells under fluid shear stress to mimic the trophoblastic barrier. *Biochim. Biophys. Acta Gen. Subj.* **1863**, 1608–1618 (2019).
99. Piliszek, A., Barłowska, K., Madeja, Z., Pawlak, P. & Plusa, B. Differentiation of trophectoderm in rabbit embryos is initiated in the absence of Gata3 and Cdx2. *Mech. Dev.* **145**, S79 (2017).
100. Adams, C. E. The development of rabbit eggs after culture in vitro for 1-4 days. *J. Embryol. Exp. Morphol.* **23**, 21–34 (1970).
101. Ogawa, S., Satoh, K. & Hashimoto, H. In vitro Culture of Rabbit Ova from the Single Cell to the Blastocyst Stage. *Nature* **233**, 422–424 (1971).
102. Hohn, H. P., Mootz, U. & Denker, H. W. Development of rabbit preimplantation blastocysts cultured with precultured endometrial tissue. *J. Reprod. Fertil.* **95**, 409–420 (1992).
103. Li, J. & Foote, R. H. Culture of rabbit zygotes into blastocysts in protein-free medium with one to twenty per cent oxygen. *Reproduction* **98**, 163–167 (1993).
104. Sultana, F., Hatori, M., Shimosawa, N., Ebisawa, T. & Sankai, T. Continuous observation of rabbit preimplantation embryos in vitro by using a culture device connected to a microscope. *J. Am. Assoc. Lab. Anim. Sci. JAALAS* **48**, 52–56 (2009).
105. Daniel, Joseph C. Early Growth of Rabbit Trophoblast. *Am. Nat.* **98**, 85–98 (1964).
106. Giles, J. R. & Foote, R. H. Rabbit blastocyst: Allocation of cells to the inner cell mass and trophectoderm. *Mol. Reprod. Dev.* **41**, 204–211 (1995).
107. Morgan, P. M. & Kane, M. T. Protein content of rabbit embryos: one cell to peri-implantation blastocyst. *J. Reprod. Fertil.* **97**, 101–106 (1993).
108. Van Blerkom, J., Manes, C. & Daniel, J. C. Development of preimplantation rabbit embryos in vivo and in vitro. *Dev. Biol.* **35**, 262–282 (1973).
109. Salvaing, J. *et al.* Assessment of ‘one-step’ versus ‘sequential’ embryo culture conditions through embryonic genome methylation and hydroxymethylation changes. *Hum. Reprod. Oxf. Engl.* **31**, 2471–2483 (2016).
110. Silva, A. R. R. *e et al.* Alteration of DNA demethylation dynamics by in vitro culture conditions in rabbit pre-implantation embryos. *Epigenetics* **7**, 440–446 (2012).
111. Denker, H.-W. & Gerdes, H.-J. The dynamic structure of rabbit blastocyst coverings: I. Transformation during regular preimplantation development. *Anat. Embryol. (Berl.)* **157**, 15–34 (1979).
112. Wolgemuth, D. J., Celenza, J., Bundman, D. S. & Dunbar, B. S. Formation of the rabbit zona pellucida and its relationship to ovarian follicular development. *Dev. Biol.* **106**, 1–14 (1984).
113. Lee, V. H. & Dunbar, B. S. Developmental Expression of the Rabbit 55-kDa Zona Pellucida Protein and Messenger RNA in Ovarian Follicles. *Dev. Biol.* **155**, 371–382 (1993).
114. Seidel, G. E., Bowen, R. A. & Kane, M. T. In Vitro Fertilization, Culture, and Transfer of Rabbit Ova. *Fertil. Steril.* **27**, 861–870 (1976).
115. Ryan, A. Q., Chan, C. J., Graner, F. & Hiiragi, T. Lumen Expansion Facilitates Epiblast-Primitive Endoderm Fate Specification during Mouse Blastocyst Formation. *Dev. Cell* **51**, 684-697.e4 (2019).
116. Chan, C. J. *et al.* Hydraulic control of mammalian embryo size and cell fate. *Nature* **571**, 112–116 (2019).
117. Tarkowski, A. K. & Wróblewska, J. Development of blastomeres of mouse eggs isolated at the 4- and 8-cell stage. *J. Embryol. Exp. Morphol.* **18**, 155–180 (1967).
118. Johnson, M. H. & Ziomek, C. A. Induction of polarity in mouse 8-cell blastomeres: specificity, geometry, and stability. *J. Cell Biol.* **91**, 303–308 (1981).
119. Houlston, E. Redistribution of microtubules and pericentriolar material during the development of polarity in mouse blastomeres. *J. Cell Biol.* **104**, 1299–1308 (1987).

120. Srinivas, S. & Rodriguez, T. A. A Tale of Division and Polarization in the Mammalian Embryo. *Dev. Cell* **40**, 215–216 (2017).
121. Hirate, Y. *et al.* Polarity-dependent distribution of angiominin localizes Hippo signaling in preimplantation embryos. *Curr. Biol. CB* **23**, 1181–1194 (2013).
122. Yagi, R. *et al.* Transcription factor TEAD4 specifies the trophoctoderm lineage at the beginning of mammalian development. *Development* **134**, 3827–3836 (2007).
123. Nishioka, N. *et al.* Tead4 is required for specification of trophoctoderm in pre-implantation mouse embryos. *Mech. Dev.* **125**, 270–283 (2008).
124. Niwa, H. *et al.* Interaction between Oct3/4 and Cdx2 Determines Trophoctoderm Differentiation. *Cell* **123**, 917–929 (2005).
125. Anderson, E., Condon, W. & Sharp, D. A study of oogenesis and early embryogenesis in the rabbit, *Oryctolagus cuniculus*, with special reference to the structural changes of mitochondria. *J. Morphol.* **130**, 67–91 (1970).
126. Warner, S. M., Conlon, F. V. & Kane, M. T. Inositol transport in preimplantation rabbit embryos: effects of embryo stage, sodium, osmolality and metabolic inhibitors. *Reprod. Camb. Engl.* **125**, 479–493 (2003).
127. Kaneko, K. J. & DePamphilis, M. L. TEAD4 establishes the energy homeostasis essential for blastocoel formation. *Development* **140**, 3680–3690 (2013).
128. Kumar, R. P. *et al.* Regulation of energy metabolism during early mammalian development: TEAD4 controls mitochondrial transcription. *Dev. Camb. Engl.* **145**, (2018).
129. Yagi, R. *et al.* Transcription factor TEAD4 specifies the trophoctoderm lineage at the beginning of mammalian development. *Dev. Camb. Engl.* **134**, 3827–3836 (2007).
130. Wu, G. *et al.* Initiation of trophoctoderm lineage specification in mouse embryos is independent of Cdx2. *Dev. Camb. Engl.* **137**, 4159–4169 (2010).
131. Ralston, A. *et al.* Gata3 regulates trophoblast development downstream of Tead4 and in parallel to Cdx2. *Dev. Camb. Engl.* **137**, 395–403 (2010).
132. Home, P. *et al.* Altered subcellular localization of transcription factor TEAD4 regulates first mammalian cell lineage commitment. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **109**, 7362–7367 (2012).
133. Ito, K. & Suda, T. Metabolic requirements for the maintenance of self-renewing stem cells. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **15**, 243–256 (2014).
134. Daniel, J. C. & Kennedy, J. R. Crystalline inclusion bodies in rabbit embryos. *J. Embryol. Exp. Morphol.* **44**, 31–43 (1978).
135. Enderasn, A. C. & Schlafke, S. J. The Fine Structure of the Blastocyst: Some Comparative Studies. in *Ciba Foundation Symposium - Preimplantation Stages of Pregnancy* 29–59 (John Wiley & Sons, Ltd, 2008). doi:10.1002/9780470719435.ch3.
136. Davies, J. & Wimsatt, W. A. Observation on the fine structure of the sheep placenta. *Acta Anat. (Basel)* **65**, 182–223 (1966).
137. Pereda, J. & Croxatto, H. B. Human preimplantation development in vivo: ultrastructural observations. *Ann. Acad. Med. Singapore* **21**, 480–488 (1992).
138. Kazemi, M. *et al.* A Progesterone-Modulated, Low-Molecular-Weight Protein from the Uterus of the Sheep is Associated with Crystalline Inclusion Bodies in Uterine Epithelium and Embryonic Trophoctoderm1. *Biol. Reprod.* **43**, 80–96 (1990).
139. Nakao, K., Meyer, C. J. & Noda, Y. Progesterone-specific protein crystals in the endometrium: An electron microscopic study. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **111**, 1034–1038 (1971).
140. Hoffman, L. H. & Olson, G. E. Crystalline inclusions in the rabbit blastocyst. *Exp. Cell Res.* **127**, 1–14 (1980).
141. Gray, C. A. *et al.* Discovery and characterization of an epithelial-specific galectin in the endometrium that forms crystals in the trophoctoderm. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**, 7982–7987 (2004).
142. Farmer, J. L. *et al.* Galectin 15 (LGALS15) functions in trophoctoderm migration and attachment. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* **22**, 548–560 (2008).

143. Kolundžić, N. *et al.* Galectin-1 Is Part of Human Trophoblast Invasion Machinery - A Functional Study In Vitro. *PLoS ONE* **6**, (2011).
144. Bojić-Trbojević, Ž. *et al.* Interaction of extravillous trophoblast galectin-1 and mucin(s)—Is there a functional relevance? *Cell Adhes. Migr.* **10**, 179–188 (2016).
145. Bojić-Trbojević, Ž. *et al.* Human trophoblast requires galectin-3 for cell migration and invasion. *Sci. Rep.* **9**, 1–15 (2019).
146. Rinaudo, P. F., Giritharan, G., Talbi, S., Dobson, A. T. & Schultz, R. M. Effects of oxygen tension on gene expression in preimplantation mouse embryos. *Fertil. Steril.* **86**, 1265.e1-1265.e36 (2006).
147. Pfeifer, N. *et al.* Selection of the In Vitro Culture Media Influences mRNA Expression of Hedgehog Genes, Il-6, and Important Genes regarding Reactive Oxygen Species in Single Murine Preimplantation Embryos. *The Scientific World Journal* <https://www.hindawi.com/journals/tswj/2012/479315/> (2012) doi:<https://doi.org/10.1100/2012/479315>.
148. Arias, M. E., Ross, P. J. & Felmer, R. N. Culture medium composition affects the gene expression pattern and in vitro development potential of bovine somatic cell nuclear transfer (SCNT) embryos. *Biol. Res.* **46**, 452–462 (2013).
149. López-Pelayo, I., Gutiérrez-Romero, J. M., Armada, A. I. M., Calero-Ruiz, M. M. & de Acevedo-Yagüe, P. J. M. Comparison of two commercial embryo culture media (SAGE-1 step single medium vs. G1-PLUS™/G2-PLUS™ sequential media): Influence on in vitro fertilization outcomes and human embryo quality. *JBRA Assist. Reprod.* **22**, 128–133 (2018).
150. Simopoulou, M. *et al.* Considerations Regarding Embryo Culture Conditions: From Media to Epigenetics. *Vivo Athens Greece* **32**, 451–460 (2018).
151. Aiken, C. E. M., Swoboda, P. P. L., Skepper, J. N. & Johnson, M. H. The direct measurement of embryogenic volume and nucleo-cytoplasmic ratio during mouse pre-implantation development. *Reproduction* **128**, 527–535 (2004).
152. Jang, H., Yang, J., Lee, E. & Cheong, J.-H. Metabolism in embryonic and cancer stemness. *Arch. Pharm. Res.* **38**, 381–388 (2015).
153. Ottosen, L. D. M., Hindkjær, J., Lindenberg, S. & Ingerslev, H. J. Murine pre-embryo oxygen consumption and developmental competence. *J. Assist. Reprod. Genet.* **24**, 359–365 (2007).
154. de Souza, D. K., Salles, L. P. & Rosa e Silva, A. A. M. Aspects of energetic substrate metabolism of in vitro and in vivo bovine embryos. *Braz. J. Med. Biol. Res.* **48**, 191–197 (2015).
155. Guérin, P., El Moutassim, S. & Ménézo, Y. Oxidative stress and protection against reactive oxygen species in the pre-implantation embryo and its surroundings. *Hum. Reprod. Update* **7**, 175–189 (2001).
156. Yang, H. W. *et al.* Detection of reactive oxygen species (ROS) and apoptosis in human fragmented embryos. *Hum. Reprod.* **13**, 998–1002 (1998).
157. Dumollard, R., Duchen, M. & Carroll, J. The Role of Mitochondrial Function in the Oocyte and Embryo. in *Current Topics in Developmental Biology* vol. 77 21–49 (Academic Press, 2007).
158. Betts, D. H. & Madan, P. Permanent embryo arrest: molecular and cellular concepts. *Mol. Hum. Reprod.* **14**, 445–453 (2008).
159. Dumollard, R., Carroll, J., Duchen, M. R., Campbell, K. & Swann, K. Mitochondrial function and redox state in mammalian embryos. *Semin. Cell Dev. Biol.* **20**, 346–353 (2009).
160. Takahashi, M. Oxidative Stress and Redox Regulation on *In Vitro* Development of Mammalian Embryos. *J. Reprod. Dev.* **58**, 1–9 (2012).
161. Mastroianni, L. & Jones, R. Oxygen tension within the rabbit fallopian tube. *Reproduction* **9**, 99–102 (1965).
162. Fischer, B. & Bavister, B. D. Oxygen tension in the oviduct and uterus of rhesus monkeys, hamsters and rabbits. *Reproduction* **99**, 673–679 (1993).
163. Li, S. & Winuthayanon, W. Oviduct: roles in fertilization and early embryo development. *J. Endocrinol.* **232**, R1–R26 (2017).

164. Batt, P. A., Gardner, D. K. & Cameron, A. W. Oxygen concentration and protein source affect the development of preimplantation goat embryos in vitro. *Reprod. Fertil. Dev.* **3**, 601–607 (1991).
165. Kitagawa, Y., Suzuki, K., Yoneda, A. & Watanabe, T. Effects of oxygen concentration and antioxidants on the in vitro developmental ability, production of reactive oxygen species (ROS), and DNA fragmentation in porcine embryos. *Theriogenology* **62**, 1186–1197 (2004).
166. Bavister, B. Oxygen concentration and preimplantation development. *Reprod. Biomed. Online* **9**, 484–486 (2004).
167. Wale, P. L. & Gardner, D. K. The effects of chemical and physical factors on mammalian embryo culture and their importance for the practice of assisted human reproduction. *Hum. Reprod. Update* **22**, 2–22 (2016).
168. Lindenau, A. & Fischer, B. Effect of oxygen concentration in the incubator's gas phase on the development of cultured preimplantation rabbit embryos. *Theriogenology* **41**, 889–898 (1994).
169. Johnson, M. H. & Nasr-Esfahani, M. H. Radical solutions and cultural problems: could free oxygen radicals be responsible for the impaired development of preimplantation mammalian embryos in vitro? *BioEssays News Rev. Mol. Cell. Dev. Biol.* **16**, 31–38 (1994).
170. Pierce, G. B., Parchment, R. E. & Lewellyn, A. L. Hydrogen peroxide as a mediator of programmed cell death in the blastocyst. *Differ. Res. Biol. Divers.* **46**, 181–186 (1991).
171. Abramczuk, J., Solter, D. & Koprowski, H. The beneficial effect of EDTA on development of mouse one-cell embryos in chemically defined medium. *Dev. Biol.* **61**, 378–383 (1977).
172. Nonogaki, T., Noda, Y., Narimoto, K., Umaoka, Y. & Mori, T. Effects of superoxide dismutase on mouse in vitro fertilization and embryo culture system. *J. Assist. Reprod. Genet.* **9**, 274–280 (1992).
173. Orsi, N. M. & Leese, H. J. Protection against reactive oxygen species during mouse preimplantation embryo development: Role of EDTA, oxygen tension, catalase, superoxide dismutase and pyruvate. *Mol. Reprod. Dev.* **59**, 44–53 (2001).
174. Zaken, V., Kohen, R. & Ornoy, A. Vitamins C and E improve rat embryonic antioxidant defense mechanism in diabetic culture medium. *Teratology* **64**, 33–44 (2001).
175. Luvoni, G. C., Keskinetepe, L. & Brackett, B. G. Improvement in bovine embryo production in vitro by glutathione-containing culture media. *Mol. Reprod. Dev.* **43**, 437–443 (1996).
176. Reis, A. *et al.* Consequences of exposure to serum, with or without vitamin E supplementation, in terms of the fatty acid content and viability of bovine blastocysts produced in vitro. *Reprod. Fertil. Dev.* **15**, 275 (2003).
177. Li, J., Foote, R. H. & Simkin, M. Development of Rabbit Zygotes Cultured in Protein-Free Medium with Catalase, Taurine, or Superoxide Dismutase1. *Biol. Reprod.* **49**, 33–37 (1993).
178. Harvey, A. J., Kind, K. L. & Thompson, J. G. Regulation of gene expression in bovine blastocysts in response to oxygen and the iron chelator desferrioxamine. *Biol. Reprod.* **77**, 93–101 (2007).
179. Dunwoodie, S. L. The Role of Hypoxia in Development of the Mammalian Embryo. *Dev. Cell* **17**, 755–773 (2009).
180. Forristal, C. E., Wright, K. L., Hanley, N. A., Oreffo, R. O. C. & Houghton, F. D. Hypoxia inducible factors regulate pluripotency and proliferation in human embryonic stem cells cultured at reduced oxygen tensions. *Reprod. Camb. Engl.* **139**, 85–97 (2010).
181. Szablowska-Gadomska, I., Zayat, V. & Buzanska, L. Influence of low oxygen tensions on expression of pluripotency genes in stem cells. *Acta Neurobiol. Exp. (Warsz.)* **71**, 86–93 (2011).
182. Lim, H.-J. *et al.* Biochemical and morphological effects of hypoxic environment on human embryonic stem cells in long-term culture and differentiating embryoid bodies. *Mol. Cells* **31**, 123–132 (2011).
183. Chu, L.-F. *et al.* Single-cell RNA-seq reveals novel regulators of human embryonic stem cell differentiation to definitive endoderm. *Genome Biol.* **17**, 173 (2016).
184. Jeong, W., Bazer, F. W., Song, G. & Kim, J. Expression of hypoxia-inducible factor-1 by trophectoderm cells in response to hypoxia and epidermal growth factor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **469**, 176–182 (2016).

185. Cowden Dahl, K. D. *et al.* Hypoxia-Inducible Factors 1 α and 2 α Regulate Trophoblast Differentiation. *Mol. Cell. Biol.* **25**, 10479–10491 (2005).
186. Ma, Y. Y., Chen, H.-W. & Tzeng, C.-R. Low oxygen tension increases mitochondrial membrane potential and enhances expression of antioxidant genes and implantation protein of mouse blastocyst cultured in vitro. *J. Ovarian Res.* **10**, (2017).
187. Kim, J., Tchernyshyov, I., Semenza, G. L. & Dang, C. V. HIF-1-mediated expression of pyruvate dehydrogenase kinase: A metabolic switch required for cellular adaptation to hypoxia. *Cell Metab.* **3**, 177–185 (2006).
188. Sakurai, M., Suzuki, C. & Yoshioka, K. Effect of knockout serum replacement supplementation to culture medium on porcine blastocyst development and piglet production. *Theriogenology* **83**, 679-686.e1 (2015).
189. Mun, S.-E. *et al.* Dual effect of fetal bovine serum on early development depends on stage-specific reactive oxygen species demands in pigs. *PLoS ONE* **12**, (2017).
190. Garcia-Gonzalo, F. & Izpisua Belmonte, C. J. Composition of Knockout Serum Replacement. (2015).
191. Flynn, T. J. & Hillman, N. The metabolism of exogenous fatty acids by preimplantation mouse embryos developing in vitro. *Development* **56**, 157–168 (1980).
192. Yamada, M. *et al.* A medium-chain fatty acid as an alternative energy source in mouse preimplantation development. *Sci. Rep.* **2**, 930 (2012).
193. Han, M.-S. & Niwa, K. Effects of BSA and fetal bovine serum in culture medium on development of rat embryos. *J. Reprod. Dev.* **49**, 235–242 (2003).
194. Iniesta-Cuerda, M. *et al.* Influence of foetal calf serum supplementation during in vitro embryo culture in Iberian red deer. *Reprod. Domest. Anim.* **54**, 69–71 (2019).
195. Wang, S., Liu, Y., Holyoak, G. R. & Bunch, T. D. The effects of bovine serum albumin and fetal bovine serum on the development of pre- and postcleavage-stage bovine embryos cultured in modified CR2 and M199 media. *Anim. Reprod. Sci.* **48**, 37–45 (1997).
196. Dobrinsky, J. R., Johnson, L. A. & Rath, D. Development of a culture medium (BECM-3) for porcine embryos: effects of bovine serum albumin and fetal bovine serum on embryo development. *Biol. Reprod.* **55**, 1069–1074 (1996).
197. Alam, M. E. *et al.* Feline embryo development in commercially available human media supplemented with fetal bovine serum. *J. Vet. Med. Sci.* **81**, 629–635 (2019).
198. Fernández-González, R. *et al.* Analysis of gene transcription alterations at the blastocyst stage related to the long-term consequences of in vitro culture in mice. *Reprod. Camb. Engl.* **137**, 271–283 (2009).
199. Fauque, P. *et al.* In Vitro Fertilization and Embryo Culture Strongly Impact the Placental Transcriptome in the Mouse Model. *PLoS ONE* **5**, e9218 (2010).
200. Fernández-Gonzalez, R. *et al.* Long-term effect of in vitro culture of mouse embryos with serum on mRNA expression of imprinting genes, development, and behavior. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**, 5880–5885 (2004).
201. Young, L. E., Sinclair, K. D. & Wilmut, I. Large offspring syndrome in cattle and sheep. *Rev. Reprod.* **3**, 155–163 (1998).
202. Gray, C. W., Morgan, P. M. & Kane, M. T. Purification of an embryotrophic factor from commercial bovine serum albumin and its identification as citrate. *Reproduction* **94**, 471–480 (1992).
203. McKiernan, S. H. & Bavister, B. D. Different lots of bovine serum albumin inhibit or stimulate in vitro development of hamster embryos. *Vitro Cell. Dev. Biol. J. Tissue Cult. Assoc.* **28A**, 154–156 (1992).
204. Kane, M. T. A low molecular weight extract of bovine serum albumin stimulates rabbit blastocyst cell division and expansion in vitro. *J. Reprod. Fertil.* **73**, 147–150 (1985).
205. Global Assisted Reproductive Technology Market to Surpass US\$ 37.6 Billion by 2027 – Coherent Market Insights. *Bloomberg.com* (2019).

206. Gardner, D. K. & Lane, M. Culture and selection of viable blastocysts: a feasible proposition for human IVF? *Hum. Reprod. Update* **3**, 367–382 (1997).
207. Morbeck, D. E. *et al.* Composition of commercial media used for human embryo culture. *Fertil. Steril.* **102**, 759-766.e9 (2014).
208. Chatot, C. L., Ziomek, C. A., Bavister, B. D., Lewis, J. L. & Torres, I. An improved culture medium supports development of random-bred 1-cell mouse embryos in vitro. *J. Reprod. Fertil.* **86**, 679–688 (1989).
209. Lawitts, J. A. & Biggers, J. D. Optimization of mouse embryo culture media using simplex methods. *J. Reprod. Fertil.* **91**, 543–556 (1991).
210. Gandhi, A. P., Lane, M., Gardner, D. K. & Krisher, R. L. A single medium supports development of bovine embryos throughout maturation, fertilization and culture. *Hum. Reprod. Oxf. Engl.* **15**, 395–401 (2000).
211. Elhassan, Y. M. *et al.* Amino acid concentrations in fluids from the bovine oviduct and uterus and in KSOM-based culture media. *Theriogenology* **55**, 1907–1918 (2001).
212. Petters, R. M., Johnson, B. H., Reed, M. L. & Archibong, A. E. Glucose, glutamine and inorganic phosphate in early development of the pig embryo in vitro. *J. Reprod. Fertil.* **89**, 269–275 (1990).
213. Pollard, J. W., Plante, C. & Leibo, S. P. Comparison of development of pig zygotes and embryos in simple and complex culture media. *J. Reprod. Fertil.* **103**, 331–337 (1995).
214. Macháty, Z., Day, B. N. & Prather, R. S. Development of early porcine embryos in vitro and in vivo. *Biol. Reprod.* **59**, 451–455 (1998).
215. Biggers, J. D. & Racowsky, C. The development of fertilized human ova to the blastocyst stage in KSOM(AA) medium: is a two-step protocol necessary? *Reprod. Biomed. Online* **5**, 133–140 (2002).
216. Wiemer, K. E., Anderson, A. R., Kyslinger, M. L. & Weikert, M. L. Embryonic development and pregnancies following sequential culture in human tubal fluid and a modified simplex optimized medium containing amino acids. *Reprod. Biomed. Online* **5**, 323–327 (2002).
217. Gardner, D. K. & Lane, M. Alleviation of the '2-cell block' and development to the blastocyst of CF1 mouse embryos: role of amino acids, EDTA and physical parameters. *Hum. Reprod. Oxf. Engl.* **11**, 2703–2712 (1996).
218. Gardner, D. Culture and selection of viable blastocysts: a feasible proposition for human IVF? *Hum. Reprod. Update* **3**, 367–382 (1997).
219. Curnow, E. c., Pawitri, D. & Hayes, E. s. Sequential culture medium promotes the in vitro development of *Macaca fascicularis* embryos to blastocysts. *Am. J. Primatol.* **57**, 203–212 (2002).
220. Lane, M., Gardner, D. K., Hasler, M. J. & Hasler, J. F. Use of G1.2/G2.2 media for commercial bovine embryo culture: equivalent development and pregnancy rates compared to co-culture. *Theriogenology* **60**, 407–419 (2003).
221. Gandhi, A. P., Lane, M., Gardner, D. K. & Krisher, R. L. Substrate utilization in porcine embryos cultured in NCSU23 and G1.2/G2.2 sequential culture media. *Mol. Reprod. Dev.* **58**, 269–275 (2001).
222. Gardner, D. K. Changes in requirements and utilization of nutrients during mammalian preimplantation embryo development and their significance in embryo culture. *Theriogenology* **49**, 83–102 (1998).
223. Summers, M. C. & Biggers, J. D. Chemically defined media and the culture of mammalian preimplantation embryos: historical perspective and current issues. *Hum. Reprod. Update* **9**, 557–582 (2003).
224. Fischer, B., Schumacher, A., Hegele-Hartung, C. & Beier, H. M. Potential risk of light and room temperature exposure to preimplantation embryos. *Fertil. Steril.* **50**, 938–944 (1988).
225. Umaoka, Y. *et al.* Effect of visual light on in vitro embryonic development in the hamster. *Theriogenology* **38**, 1043–1054 (1992).

226. Gürke, J. *et al.* Maternal diabetes promotes mTORC1 downstream signalling in rabbit preimplantation embryos. *Reprod. Camb. Engl.* **151**, 465–476 (2016).
227. Ramin, N. *et al.* Maternal Diabetes Impairs Gastrulation and Insulin and IGF-I Receptor Expression in Rabbit Blastocysts. *Endocrinology* **151**, 4158–4167 (2010).
228. Seeling, T. *et al.* A Diabetic Pregnancy Alters the Expression of Stress-Related Receptors in Gastrulating Rabbit Blastocyst and in the Reproductive Tract. *Reprod. Sci.* **25**, 174–184 (2018).
229. Schindler, M. *et al.* Maternal Diabetes Leads to Unphysiological High Lipid Accumulation in Rabbit Preimplantation Embryos. *Endocrinology* **155**, 1498–1509 (2014).
230. Haucke, E. *et al.* Accumulation of advanced glycation end products in the rabbit blastocyst under maternal diabetes. *Reprod. Camb. Engl.* **148**, 169–178 (2014).
231. Iritani, A., Nishikawa, Y., Gomes, W. R. & VanDemark, N. L. Secretion Rates and Chemical Composition of Oviduct and Uterine Fluids in Rabbits. *J. Anim. Sci.* **33**, 829–835 (1971).
232. Lane, M. & Gardner, D. K. Nonessential amino acids and glutamine decrease the time of the first three cleavage divisions and increase compaction of mouse zygotes in vitro. *J. Assist. Reprod. Genet.* **14**, 398–403 (1997).
233. Lane, M. & Gardner, D. Differential regulation of mouse embryo development and viability by amino acids. *J. Reprod. Fertil.* **109**, 153–64 (1997).
234. Al-Luhbi, F. M. & Al-Bashan, M. M. Toward a Rabbit-Optimized Culture Medium: Impact of Supplementation with Amino Acids on Early Development of in vitro Cultured Rabbit Embryos. <https://www.semanticscholar.org/paper/Toward-a-Rabbit-Optimized-Culture-Medium%3A-Impact-of-Al-Luhbi-Al-Bashan/99b54af85a79d06490b659a822f78525e4617c58> (2013).
235. Eagle, H. Amino acid metabolism in mammalian cell cultures. *Science* **130**, 432–437 (1959).
236. Ho, Y., Wigglesworth, K., Eppig, J. J. & Schultz, R. M. Preimplantation development of mouse embryos in KSOM: Augmentation by amino acids and analysis of gene expression. *Mol. Reprod. Dev.* **41**, 232–238 (1995).
237. Biggers, J. D., McGinnis, L. K. & Raffin, M. Amino Acids and Preimplantation Development of the Mouse in Protein-Free Potassium Simplex Optimized Medium. *Biol. Reprod.* **63**, 281–293 (2000).
238. Lane, M. & Gardner, D. K. Increase in postimplantation development of cultured mouse embryos by amino acids and induction of fetal retardation and exencephaly by ammonium ions. *Reproduction* **102**, 305–312 (1994).
239. Lane, M. & Gardner, D. K. Differential regulation of mouse embryo development and viability by amino acids. *Reproduction* **109**, 153–164 (1997).
240. Lane, M. & Gardner, D. K. Amino acids and vitamins prevent culture-induced metabolic perturbations and associated loss of viability of mouse blastocysts. *Hum. Reprod. Oxf. Engl.* **13**, 991–997 (1998).
241. Perin, P. M., Maluf, M., Nicolosi Foltran Januário, D. A. & Nascimento Saldiva, P. H. Comparison of the efficacy of two commercially available media for culturing one-cell embryos in the in vitro fertilization mouse model. *Fertil. Steril.* **90**, 1503–1510 (2008).
242. Gardner, D. K. & Lane, M. Development of Viable Mammalian Embryos In Vitro. in *Principles of Cloning* 187–213 (Elsevier, 2002). doi:10.1016/B978-012174597-4.50011-9.
243. Herrick, J. R., Paik, T., Strauss, K. J., Schoolcraft, W. B. & Krisher, R. L. Building a better mouse embryo assay: effects of mouse strain and in vitro maturation on sensitivity to contaminants of the culture environment. *J. Assist. Reprod. Genet.* **33**, 237–245 (2016).
244. Paternot, G., Debrock, S., D’Hooghe, T. M. & Spiessens, C. Early embryo development in a sequential versus single medium: a randomized study. *Reprod. Biol. Endocrinol.* **8**, 83 (2010).
245. Dieamant, F. *et al.* Single versus sequential culture medium: which is better at improving ongoing pregnancy rates? A systematic review and meta-analysis. *JBRA Assist. Reprod.* **21**, 240–246 (2017).
246. Nancarrow, C. D. & Hill, J. L. Co-culture, oviduct secretion and the function of oviduct-specific glycoproteins. *Cell Biol. Int.* **18**, 1105–1114 (1994).

247. Liu, L. P., Chan, S. T., Ho, P. C. & Yeung, W. S. Partial purification of embryotrophic factors from human oviductal cells. *Hum. Reprod. Oxf. Engl.* **13**, 1613–1619 (1998).
248. Xu, J. S., Cheung, T. M., Chan, S. T., Ho, P. C. & Yeung, W. S. Temporal effect of human oviductal cell and its derived embryotrophic factors on mouse embryo development. *Biol. Reprod.* **65**, 1481–1488 (2001).
249. Mishra, S., Lei, Z. M. & Rao, C. V. A novel role of luteinizing hormone in the embryo development in cocultures. *Biol. Reprod.* **68**, 1455–1462 (2003).
250. Paria, B. C. & Dey, S. K. Preimplantation embryo development in vitro: cooperative interactions among embryos and role of growth factors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **87**, 4756–4760 (1990).
251. Hardy, K. & Spanos, S. Growth factor expression and function in the human and mouse preimplantation embryo. *J. Endocrinol.* **172**, 221–236 (2002).
252. Vithoulkas, A., Levanduski, M., Goudas, V. T. & Illmensee, K. Co-culture of human embryos with autologous cumulus cell clusters and its beneficial impact of secreted growth factors on preimplantation development as compared to standard embryo culture in assisted reproductive technologies (ART). *Middle East Fertil. Soc. J.* **22**, 317–322 (2017).
253. Bastias, M. C., McGee-Belser, S. T., Bryan, S. H. & Vasquez, J. M. In vitro deleterious effect of hypoxanthine in Ham's Nutrient Mixture F-10 * culture medium on human oocyte fertilization and early embryonic development †. *Fertil. Steril.* **60**, 876–880 (1993).
254. Tsai, F. C. & Gardner, D. K. Nicotinamide, a component of complex culture media, inhibits mouse embryo development in vitro and reduces subsequent developmental potential after transfer. *Fertil. Steril.* **61**, 376–382 (1994).
255. Harvey, M. B., Arcellana-Panlilio, M. Y., Zhang, X., Schultz, G. A. & Watson, A. J. Expression of Genes Encoding Antioxidant Enzymes in Preimplantation Mouse and Cow Embryos and Primary Bovine Oviduct Cultures Employed for Embryo Coculture. *Biol. Reprod.* **53**, 532–540 (1995).
256. Lim, J. M. & Hansel, W. Roles of growth factors in the development of bovine embryos fertilized in vitro and cultured singly in a defined medium. *Reprod. Fertil. Dev.* **8**, 1199–1205 (1996).
257. Joo, B. S. *et al.* The mechanism of action of coculture on embryo development in the mouse model: direct embryo-to-cell contact and the removal of deleterious components. *Fertil. Steril.* **75**, 193–199 (2001).
258. Bavister, B. D. Co-culture for embryo development: is it really necessary? *Hum. Reprod. Oxf. Engl.* **7**, 1339–1341 (1992).
259. Edwards, L. J., Batt, P. A., Gandolfi, F. & Gardner, D. K. Modifications made to culture medium by bovine oviduct epithelial cells: changes to carbohydrates stimulate bovine embryo development. *Mol. Reprod. Dev.* **46**, 146–154 (1997).
260. Ouhibi, N., Hamidi, J., Guillaud, J. & Ménézo, Y. Co-culture of 1-cell mouse embryos on different cell supports. *Hum. Reprod. Oxf. Engl.* **5**, 737–743 (1990).
261. Camous, S., Heyman, Y., Meziou, W. & Menezzo, Y. Cleavage beyond the block stage and survival after transfer of early bovine embryos cultured with trophoblastic vesicles. *Reproduction* **72**, 479–485 (1984).
262. Cole, R. J., Edwards, R. G. & Paul, J. Cytodifferentiation in cell colonies and cell strains derived from cleaving ova and blastocysts of the rabbit. *Exp. Cell Res.* **37**, 501–504 (1965).
263. Eyestone, W. H. & First, N. L. Co-culture of early cattle embryos to the blastocyst stage with oviducal tissue or in conditioned medium. *J. Reprod. Fertil.* **85**, 715–720 (1989).
264. Ménézo, Y. J., Sakkas, D. & Janny, L. Co-culture of the early human embryo: factors affecting human blastocyst formation in vitro. *Microsc. Res. Tech.* **32**, 50–56 (1995).
265. Magli, M. C. *et al.* Human embryo co-culture: results of a randomized prospective study. *Int. J. Fertil. Menopausal Stud.* **40**, 254–259 (1995).
266. Jayot, S. *et al.* Coculture of embryos on homologous endometrial cells in patients with repeated failures of implantation. *Fertil. Steril.* **63**, 109–114 (1995).
267. Carney, E. W., Tobback, C. & Foote, R. H. Co-culture of rabbit one-cell embryos with rabbit oviduct epithelial cells. *In Vitro Cell. Dev. Biol.* **26**, 629–635 (1990).

268. Cabrera, L. M., Bormann, C. L., Heo, Y. S., Takayama, S. & Smith, G. D. Improved embryo development with microfluidic dynamic culture is exposure time-dependent, developmental stage-independent and oxygen-independent. *Fertil. Steril.* **90**, S108–S109 (2008).
269. Matsuura, K. *et al.* Improved development of mouse and human embryos using a tilting embryo culture system. *Reprod. Biomed. Online* **20**, 358–364 (2010).
270. Hara, T. *et al.* A tilting embryo culture system increases the number of high-grade human blastocysts with high implantation competence. *Reprod. Biomed. Online* **26**, 260–268 (2013).