

УДК 611.013.15.31.085.2.089:615.014.41

М.П. Петрушко*^{1,2}, В.І. Пінєєв^{1,2}

Амінокислотний профіль середовищ співкультивування доімплантаційних ембріонів людини *in vitro* на моношарі свіжовиділених або кріоконсервованих клітин кумулюса та гранульози

UDC 611.013.15.31.085.2.089:615.014.41

M.P. Petrushko*^{1,2}, V.I. Pinyayev^{1,2}

Media Amino Acid Profile During In Vitro Co-Culture of Human Pre-Implantation Embryos on Monolayer of Fresh or Cryopreserved Cumulus and Granulosa Cells

Реферат: При співкультивуванні з клітинами кумулюса та гранульози (КГК) створюється мікрооточення, яке може забезпечити нормальний ріст та розвиток доімплантаційних ембріонів людини *in vitro*. Визначення кількісного та якісного складу такого середовища має важливе значення під час створення систем культивування ембріонів людини *in vitro*. У роботі використовували ембріони людини п'ятої доби розвитку (стадія бластоцисти), моношарові культури свіжовиділених та кріоконсервованих КГК. Досліджували вплив культивування на моношаровій культурі свіжовиділених та кріоконсервованих КГК на морфокінетичні характеристики доімплантаційних ембріонів людини, отриманих *in vitro*, та амінокислотний профіль середовищ культивування. Встановлено, що кріоконсервування не впливає на здатність КГК підтримувати розвиток доімплантаційних ембріонів та покращує їх якість. Визначено відмінність амінокислотного складу стандартного середовища та середовищ співкультивування на моношарі нативної або кріоконсервованої культури кумулюса та гранульози. Присутність клітин КГК змінює біохімічний профіль середовища культивування за рахунок підвищення вмісту таких амінокислот, як триптофан, пролін, валін, орнітин та глутамін.

Ключові слова: клітини кумулюса та гранульози, кріоконсервування, амінокислота, доімплантаційні ембріони людини.

Реферат: При сокультуванні с клетками кумулюса и гранулезы (КГК) создается микроокружение, которое может обеспечить нормальный рост и развитие доимплантационных эмбрионов человека *in vitro*. Определение количественного и качественного состава такой среды имеет важное значение при создании систем культивирования эмбрионов человека *in vitro*. В работе использовали эмбрионы человека на пятое сутки развития (стадия бластоцисты), монослой культуры свежывыделенных и криоконсервированных КГК. Исследовали влияние культивирования на монослойной культуре свежывыделенных и криоконсервированных КГК на морфокинетические характеристики доимплантационных эмбрионов человека, полученных *in vitro*, и аминокислотный профиль сред культивирования. Установлено, что криоконсервирование не влияет на способность КГК поддерживать развитие доимплантационных эмбрионов и улучшает их качество. Определены отличия аминокислотного состава стандартной среды и среды сокультурирования на монослое нативной или криоконсервированной культуры кумулюса и гранулезы. Присутствие клеток КГК изменяет биохимический профиль среды культивирования за счет повышения содержания таких аминокислот, как триптофан, пролин, валин, орнитин и глутамин.

Ключевые слова: клетки кумулюса и гранулезы, криоконсервирование, аминокислота, доимплантационные эмбрионы человека.

Abstract: Co-culturing with the cumulus and granulosa cells (CGC) provide a microenvironment which can ensure the normal growth and development of human pre-implantation embryos *in vitro*. Examining the quantitative and qualitative compositions of this environment is of an important value to produce the systems to culture human embryos *in vitro*. The paper described the human embryos of the fifth day of development (blastocyst stage), monolayer culture of cryopreserved and freshly isolated CGC. We investigated the influence of culturing on monolayer of freshly isolated and cryopreserved CGC on morphokinetic characteristics of human pre-implantation embryos obtained *in vitro* as well as the amino acid profile of the culturing media. It has been found that cryopreservation does not affect the ability of CGC to support the development of pre-implantation embryos and improves their quality. There was determined the difference in amino acid composition of the standard medium of those for co-culturing on monolayer of either native or cryopreserved culture and cumulus granulosa. The presence of CGC changes the biochemical profile of culturing medium by increasing the content of the amino acids such as tryptophan, proline, valine, ornithine and glutamine.

Key words: cumulus and granulosa cells, cryopreservation, amino acid, human pre-implantation embryos.

¹Відділ кріобіології системи репродукції, Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, м. Харків

²Медичний центр «ДРТ-клініка репродуктивної медицини», м. Харків

*Автор, якому необхідно надсилати кореспонденцію:

вул. Переяславська, 23, м. Харків, Україна 61016;
тел.: (+38 057) 373-31-19, факс: (+38 057) 373-30-84,
електронна пошта: info@artclinic.com.ua

Найдійшла 09.11.2015

Прийнята до друку 24.05.2016

¹Department of Cryobiology of Reproductive System, Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkiv, Ukraine

²Medical Center ART Clinic of Reproductive Medicine, Kharkiv, Ukraine

*To whom correspondence should be addressed:

23, Pereyaslavskaya str., Kharkiv, Ukraine 61016;
tel.: +380 57 373 3119, fax: +380 57 373 3084,
e-mail: info@artclinic.com.ua

Received November, 09, 2015

Accepted May, 24, 2016

Лікування безпліддя з використанням допоміжних репродуктивних технологій (ДРТ) передбачає вилучення ооцитів із фолікулів та їх запліднення, а також культивування ембріонів в умовах *in vitro*.

Клітини кумулюса та гранулози *in vivo* оточують яйцеклітини, забезпечуючи поживними речовинами та захищаючи їх під час міграції з яєчника до матки. Однак запліднення яйцеклітин методом інтрацитоплазматичної ін'єкції *in vitro* передбачає вилучення КГК, тому культуральне середовище має відтворювати умови оточення *in vivo* для забезпечення їх виживання, проліферації та диференціації шляхом постачання клітинам поживних та регуляторних речовин. Однак незважаючи на вдосконалення методів культивування ембріонів, ще не виявлено всіх поживних речовин, необхідних для природного розвитку ембріона. Важливу роль у середовищах культивування *in vitro* відіграють амінокислоти, але їх вплив на розвиток ембріонів остаточно не з'ясовано. Вважають, що ці речовини є одними з найбільш важливих регуляторів доімплантаційного розвитку ембріонів, оскільки вони стимулюють їх розвиток, диференціацію та підвищують імплантаційний потенціал [23].

Доімплантаційний розвиток ембріонів людини починається з запліднення ооцита і закінчується утворенням бластоцисти. В цей період поряд із морфологічними відбуваються значні фізіологічні та метаболічні зміни ембріона: перехід від материнського контролю до ембріонального та диференціація перших двох клітинних ліній, а саме внутрішньої клітинної маси і трофектодерми [3]. В оточенні *in utero* на них впливає комплекс парата аутокринних ростових факторів, амінокислот [10]. Саме тому для забезпечення умов, близьких до природних, використовують співкультивування КГК та ембріонів [2].

Одним із етапів лікування безпліддя за допомогою ДРТ є кріоконсервування ооцитів, зигот та ранніх ембріонів. Для подальшого культивування кріоконсервованих ембріонів до стадії бластоцисти необхідне створення оптимальних умов. Тому актуальним є кріоконсервування КГК та визначення впливу факторів кріоконсервування на їх здатність підтримувати розвиток ембріонів *in vitro*.

Мета роботи – дослідження впливу свіжовиділеної та кріоконсервованої культур клітин кумулюса та гранулози на морфокінетичні характеристики ембріонів, отриманих *in vitro*; визначення біохімічного профілю середовищ культивування ембріонів із метою підвищення показників лікування безпліддя з використанням допоміжних репродуктивних технологій.

Для досягнення поставленої мети необхідно було вирішити наступні завдання: дослідити вплив різних

Treatment of infertility in the frames of assisted reproductive technologies (ART) involves the removal of oocyte from the follicles and their fertilization as well as *in vitro* culturing of embryos.

Cumulus and granulosa cells *in vivo* surround the ova, provide the nutrients and protect them during the migration from the ovary to uterus. However, fertilization of oocytes by intracytoplasmic injection *in vitro* involves the removal of CGC, therefore the culture medium should reproduce the conditions of an environment *in vivo* needed for their survival, proliferation and differentiation by supplying the nutrients and regulatory substances. Despite the continuous improvement of the embryo culture methods there have not yet been found all the nutrients necessary for the normal embryo development. An important part of *in vitro* culturing media is taken by amino acids, but their impact on the development of embryos is not completely understood. These substances are believed to be among the most important regulators of pre-implantation embryos because they stimulate their development, differentiation and increase an implantation potential [23].

Pre-implantation development of human embryo starts with fertilization of oocyte and ends with the formation of blastocyst. During this period, along with morphological, significant physiological and metabolic changes in embryo took place: the transition from parent control to embryonic one and the differentiation of the first two cell lines, *i. e.* the inner cell mass and trophectoderm [1]. They are influenced *in utero* by the complex of para- and autocrine growth factors, amino acids [9]. Therefore, the creation of the conditions close to the natural ones could be achieved through the co-culturing of CGC and embryos was used [5].

One of the stages of infertility treatment using the assisted reproduction is cryopreservation of oocytes, zygotes and early embryos. For further cultivation of cryopreserved embryos up to the blastocyst stage it is crucial to provide the optimal conditions. That is why it is important to cryopreserve CGC and to determine the impact of cryopreservation factors on their ability to support the development of embryos *in vitro*.

The research aim was to investigate the effect of freshly isolated and cryopreserved cell cultures of cumulus and granulosa on the morphokinetic characteristics of embryos obtained *in vitro*; to elucidate the biochemical profile of embryo culture media to improve the treatment of infertility in the frames of assisted reproductive technologies.

To achieve this goal it was necessary to solve the following tasks: to investigate the influence of different culturing conditions on morphokinetic parameters of human pre-implantation embryos; to determine the amino acid composition of the standard culture medium



Таблиця 1. Клінічні характеристики пацієток досліджуваних груп
Table 1. Clinical characteristics of patients of studied groups

Клінічні характеристики Indices	Група 1 Group 1	Група 2 Group 2	Група 3 Group 3
Вік пацієток, роки Age of patients, years	31,5 ± 2,1	31,5 ± 2,2	30,8 ± 2,7
Стаж безпліддя, роки Infertility experience, years	6,7 ± 1,2	6,5 ± 1,2	5,2 ± 0,9
Середня кількість фолікулів на пацієтку, абс. од. Average number of follicles per patient	8,6 ± 1,3	9,3 ± 1,4	9,1 ± 1,2
Середня кількість ооцитів на пацієтку, абс. од. Average number of oocytes per patient	7,1 ± 0,9	7,5 ± 1,1	7,3 ± 1,0

умов культивування на морфокинетичні характеристики доімплантаційних ембріонів людини; визначити амінокислотний склад стандартного середовища культивування та середовищ співкультивування ембріонів зі свіжовиділеними або кріоконсервованими КГК.

Матеріали та методи

Усі маніпуляції з доімплантаційними ембріонами проводили відповідно до Європейського протоколу з захисту ембріонів [20] та рішення, затвердженого Комітетом із біоетики Інституту проблем кріобіології та кріомедицини НАН України.

Гамети та доімплантаційні ембріони людини отримували в циклах лікування безпліддя з використанням ДРТ.

Ембріони, залежно від середовища культивування, були розділені на групи: 1 – у стандартному середовищі; 2 – на моношарі свіжовиділених КГК; 3 – на моношарі кріоконсервованих КГК.

Клінічні показники пацієток наведено в табл. 1.

Вилучення ооцит-корона-кумуляусних комплексів, оцінку зрілості яйцеклітин, запліднення *in vitro* та культивування ембріонів проводили за стандартною методикою [19].

Морфофункціональні показники доімплантаційних ембріонів оцінювали за методом D. Gardner [8].

Фолікулярну рідину отримували у жінок віком 20–42 роки на 12–14-й день менструального циклу шляхом аспірації фолікулів через 34–35 годин після ін'єкції 50 000–10 000 од. людського хоріонічного гонадотропіну. Після виділення ооцитів фолікулярну рідину поміщали в конічні центрифужні пробірки і залишали за кімнатної температури на годину. Після осадження клітин (без центрифугування) надосад видаляли. Клітини ресуспендували в 3 мл культурального середовища «Sydney IVF Fertilization

and the media of co-culturing of embryos with either freshly isolated or cryopreserved CGC.

Materials and methods

All the manipulations with pre-implantation embryos were performed in accordance with the European protocol on embryo protection [20] and a decision of the Committee in Bioethics of the Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine.

Gametes and human pre-implantation embryos were derived in the cycles of infertility treatment using the ART.

Depending on the culture medium the embryos were divided into groups: 1 – cultured in standard medium; 2 – on monolayer of freshly isolated CGC; 3 – on monolayer of cryopreserved CGC.

The characteristics of participating patients are shown in Table 1.

Removal of oocyte-crown-cumulus complexes, assessment of oocyte maturity, *in vitro* fertilization and culturing of embryos were performed by the standard method [18].

Morphofunctional indices of pre-implantation embryo were estimated by D. Gardner method [7].

Follicular fluid was obtained in women aged of 20–42 years to days 12–14 of menstrual cycle by aspiration of the follicles in 34–35 hrs after injection of 50,000–10,000 units of human chorionic gonadotropin. After removal of oocytes the follicular fluid was divided and placed into conical centrifuge tubes and left at a room temperature for one hour. After deposition of the cells (with no centrifugation) the supernatant was removed. Cells were re-suspended in 3 ml of Sydney IVF Fertilization Medium (Cook, Australia) and washed three times to remove erythrocytes and debris. The cells were placed in a well and 1 ml culture medium was layered under mineral oil (Cook, Australia). The CGC were cultured in a CO₂ incubator (Sanyo, Japan) at 37°C, 5% CO₂ and 95% humidity [6].

Cumulus and granulosa cells were transferred into a 250 ml of 2 M solution of 1,2-propane diol (Dow Chemical, Germany) and frozen in plastic straws with an outer diameter of 2.5 mm, 133 mm length, 0.47 ml volume (CryoBioSystem, France) with programmable device (CryoLogic CL 8800i, Australia) using a program: cooling rate of 0.3 deg/min from 25°C down to the point of the crystallization onset. Ice seeding was performed at –6°C for 45 seconds. The samples were cooled then from –6 down to –35°C with the rate of 1 deg/min, afterwards they were immersed into liquid



Medium» («Cook», Австралія), тричі відмивали від еритроцитів та дебрису. Клітини поміщали в лунку і нашарувували 1 мл культурального середовища під мінеральною олією («Cook», Австралія). Культивування КГК проводили у CO₂-інкубаторі («Sanyo 5MO», Японія) при 37°C, 5% CO₂ та 95% вологості [7].

Клітини кумулюса та гранульози переносили в 250 мкл концентрації 2 М розчину 1,2-пропандіолу («Dow Chemical», Німеччина) та заморожували у поліетиленових соломках, які мали зовнішній діаметр 2,5 мм, довжину 133 мм, об'єм 0,47 мл («CryoBioSystem», Франція) на програмованому апараті («Cryo Logic CL 8800i», Австралія) за повільною програмою: швидкість охолодження 0,3 град/хв від 25°C до початку кристалізації. Сидінг проводили за температури -6°C протягом 45 с. Зразки охолоджували від -6 до -35°C зі швидкістю 1 град/хв, після чого їх занурювали в рідкий азот. Соломинки відігрівали на водяній бані при 37°C [1].

Кількісний аналіз вільних амінокислот на п'яту добу культивування виконували за методом PICO-TAG на амінокислотному аналізаторі «Waters» («Waters Corporation», США) [14]. Вивчали кількісний склад 20 амінокислот у різних середовищах культивування.

Статистичну обробку експериментальних даних проводили за методом Стьюдента з використанням програми «Excel» («Microsoft», США). Результати приведені у вигляді середнього значення ± стандартне відхилення. Відмінності між виборками вважали статистично значущими при $p < 0,05$.

Результати та обговорення

За результатами морфофункціонального аналізу ембріонів, які розвивалися *in vitro* в стандартному середовищі, на моношарі свіжовиділених або кріоконсервованих КГК встановлено, що їх наявність не впливала на частоту запліднення.

Упродовж перших двох діб значущих відмінностей у розвитку ембріонів усіх досліджуваних груп не відмічалось. На третю добу культивування було встановлено, що розвиток ембріонів групи 1 частіше зупинявся на стадії восьми бластомерів, а для ембріонів груп 2 та 3 був характерний швидкий темп дроблення (табл. 2).

Під час співкультивування на шарі свіжовиділених та кріоконсервованих КГК стадії морули на четверту добу досягло відповідно на 22,3 та 25%

Таблиця 2. Морфокінетичні характеристики ембріонів досліджуваних груп

Table 2. Morphokinetic characteristics of embryos of studied groups

Показники Indices	Група 1 Group 1	Група 2 Group 2	Група 3 Group 3
Кількість зигот, абс. од. Number of zygotes	6,0 ± 0,8	5,8 ± 0,8	5,9 ± 0,7
Частота запліднення, % Fertilization rate, %	84,5 ± 11,6	77,3 ± 14,4	80,8 ± 13,9
2-4 клітини, % 2-4 cells, %	98,8 ± 3,9	98,1 ± 5,2	100 ± 0,8
8 клітин, % 8 cells, %	98,1 ± 4,5	96,7 ± 6,7	98,7 ± 1,55
16 клітин, % 16 cells, %	76,9 ± 6,9	95,3 ± 7,2*	98,7 ± 4,0*
Морула, % Morula, %	73,0 ± 5,9	95,3 ± 7,2*	98,1 ± 4,5*
Бластоциста, % Blastocyst, %	28,2 ± 5,3	73,6 ± 7,9*	74,0 ± 7,7*

Примітка: * – відмінності значущі у порівнянні зі стандартним середовищем культивування, $p \leq 0,01$.

Note: * – the differences are statistically significant if compared the standard culture medium, $p \leq 0.01$.

nitrogen. The straws were thawed in water bath at 37°C [19].

Free amino acids to day 5 of culturing were quantitatively analyzed as reported by M. Kuran [13] using Waters PICO-TAG amino acid analyzer (Waters Corporation, USA). The quantitative composition of 20 amino acids in the culturing media was studied.

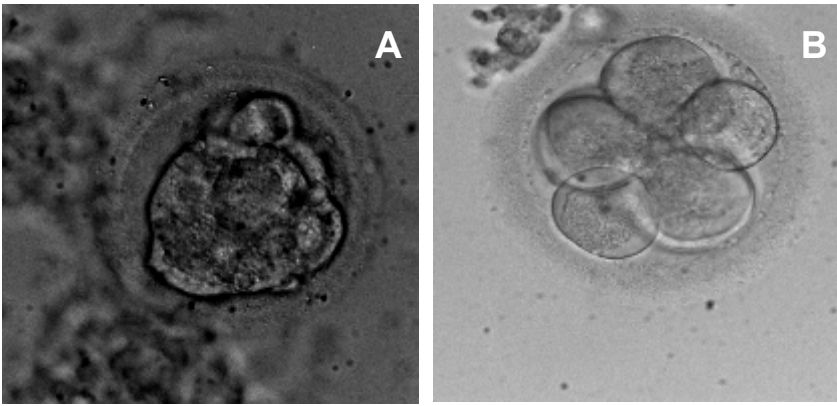
The findings were statistically analyzed using the Student's test and MS Excel (Microsoft, USA) software. The results were presented as the mean ± standard deviation. The differences between data were considered as statistically significant at $p < 0.05$.

Results and discussion

The results of morphofunctional analysis of the embryos developed *in vitro* in standard medium on monolayer of either fresh or cryopreserved CGC demonstrated that their presence did not affect the fertilization rate.

During the first two days no crucial differences for all the investigated groups of embryos were found. To day 3 of culturing there was found that the development of embryos of group 1 stopped at 8-cell stage blastomeres on a more frequent basis and for the embryos of groups 2 and 3 a fast cleavage rate was inherent (Table 2).

During co-culturing on the layer of fresh and cryopreserved CGC the morula stage to day 4 was



Ембріони людини на четверту добу культивування: **A** – компактизована морула на моношарі КГК; **B** – блок розвитку ембріона на стадії восьми бластомерів у стандартному середовищі культивування. Нативний препарат, $\times 400$.

Human embryos on day 4 of culturing: **A** – compacted morula on CGC monolayer, **B** – embryo development block at stage of eight blastomeres in standard culturing medium. Native preparation, $\times 400$.

ембріонів більше, ніж у стандартному середовищі. У середовищах зі свіжевиділеними та кріоконсервованими КГК більшість ембріонів компактизувалася, на відміну від культивування ембріонів у стандартному середовищі (рис. 1).

Наші дані співпадають із результатами D. Carrell та співавт. [6]. На їх думку, в основі цього явища лежить покращення ауто- та паракринної регуляції розвитку ембріонів у присутності клітин гранульози.

Значущі відмінності зберігалися й на п'яту добу культивування. Так, під час стандартного культивування стадії бластоцисти досягло лише $(28,2 \pm 5,3)\%$ ембріонів. У обох системах співкультивування цей показник був значуще вищим. Кріоконсервування клітин КГК не впливало на їх здатність підтримувати розвиток ембріонів *in vitro*, оскільки стадії бластоцисти досягло $(74,0 \pm 7,7)\%$ ембріонів, що статистично не відрізнялося від результатів співкультивування на моношарі свіжевиділених КГК.

На п'яту добу культивування кількість бластоцист високої категорії якості (AA, AB, BA) була вдвічі більшою у групах 2 та 3 порівняно з групою 1 (табл. 3).

Отже, культивування на моношарі як свіжевиділених, так і кріоконсервованих КГК сприяє збільшенню кількості ембріонів, які досягли стадії бластоцисти, та забезпечує високі морфологічні показники внутрішньої клітинної маси та трофодерми.

Одним із чинників, які впливають на морфологічні характеристики емб-

reached by respectively 22.3 and 25% more embryos *versus* those for the standard medium. In media with fresh and cryopreserved CGC most of the embryos were compacted unlike the case of embryos cultured in a standard medium (Fig. 1).

Our data are consistent with results of D. Carrell *et al.* [4]. In their view, this phenomenon can be explained by an improved auto- and paracrine regulation of embryos in the presence of granulosa cells.

Significant differences were also kept on day 5 of culturing. Thus, during the standard culturing only $(28.2 \pm 5.3)\%$ of embryos reached the blastocyst stage. For both systems of co-culturing this value was significantly higher. Cryopreservation of CGC did not affect their ability to support the development of embryos *in vitro*, as $(74.0 \pm 7.7)\%$ of embryos reached the blastocyst stage, that was not statistically different from the results of co-culturing on monolayer of freshly isolated CGC.

On the fifth day of culturing the number of high quality blastocysts (AA, AB, BA) was two times higher in groups 2 and 3 if compared with group 1 (Table 3).

Thus, culturing on monolayer of both fresh and cryopreserved CGC increased the number of embryos which reached the blastocyst stage, as well as provided high morphological parameters of inner cell mass and trophoderm.

One of the factors, affecting morphological characteristics of embryos during co-culturing may be the change of their biochemical environment, including

Таблиця 3. Морфологічні характеристики ембріонів на стадії бластоцисти різних досліджуваних груп на п'яту добу культивування

Table 3. Morphological characteristics of embryos at blastocyst stage of different studied groups on day 5 of culturing

Категорія якості Grades	Група 1 Group 1	Група 2 Group 2	Група 3 Group 3
AA, AB, BA	$25,5 \pm 9,3$	$48,8 \pm 8,4^*$	$49,2 \pm 9,7^*$
BB, BC, CB	$44,4 \pm 12,7$	$39,0 \pm 9,7$	$36,9 \pm 6,6$
CD, DC, DD	$31,1 \pm 2,3$	$12,2 \pm 0,9^*$	$13,9 \pm 2,2^*$

Примітка: * – відмінності значущі у порівнянні зі стандартним середовищем культивування, $p \leq 0,01$.

Note: * – the differences are statistically significant if compared the standard culture medium, $p \leq 0.01$.



ріонів під час співкультивування, може бути зміна їх біохімічного оточення, зокрема амінокислотного складу, яка викликана присутністю КГК.

У ході дослідження амінокислотного складу середовищ на п'яту добу культивування було встановлено, що у стандартному середовищі були відсутні креатинін, серин, лізин.

У стандартному середовищі (група 1) вміст гліцину та лейцину був вищим, ніж у середовищі культивування в присутності свіжовиділених або кріоконсервованих КГК, що свідчить про додаткову утилізацію цих амінокислот КГК.

Концентрація проліну, орнітину та глутаміну у середовищах із КГК збільшувалася, що, можливо, пов'язано зі секрецією цих амінокислот (табл. 4).

Цікавим фактом є збільшення концентрації незамінних амінокислот (валіну та триптофану) в середовищах співкультивування, оскільки рівень всіх інших незамінних амінокислот зменшувався.

Показано, що до процесу розвитку ембріона людини залучаються серин, аргінін, метіонін, валін та лейцин [9], тому підвищення концентрації цих амінокислот у процесі співкультивування на свіжовиділених або кріоконсервованих КГК позитивно впливає на розвиток ембріонів і покращує їх якість.

Замінні та незамінні амінокислоти відіграють різну роль у процесі розвитку ембріонів. Замінні амінокислоти прискорюють ділення внутрішньої клітинної маси і підвищують здатність ембріона до розвитку після імплантації [11]. Незамінні амінокислоти сприяють розвитку ембріона від зиготи до бластоцисти, зокрема збільшують кількість клітин трофобласта та підвищують здатність бластоцисти до вилуплення.

У людини експресія генома починається з восьми клітин, тому розвиток ембріонів під час культивування *in vitro* найчастіше зупиняється на цій стадії [15]. Блок розвитку під час активації ембріонального генома пов'язаний, імовірно, з блоком транскрипції та трансляції, уповільненням метаболізму ембріонів. Ембріон людини до стадії

Таблиця 4. Амінокислотний склад (ммоль/л) середовища культивування ембріонів людини *in vitro* на п'яту добу співкультивування (M ± m)

Table 4. Amino acid composition (mmol/L) of culturing media of human embryos *in vitro* on day 5 of co-culturing (M ± m)

Амінокислота Amino acid	Група 1 Group 1	Група 2 Group 2	Група 3 Group 3
Креатин Creatine	–	0,134 ± 0,012*	0,124 ± 0,001*
Серин Serine	–	0,019 ± 0,007	0,012 ± 0,001
Аспарагін Asparagine	0,055 ± 0,004	0,088 ± 0,006	0,086 ± 0,004
Глутамін Glutamine	0,073 ± 0,009	0,517 ± 0,039*	0,536 ± 0,022*
Гліцин Glycine	0,05 ± 0,002	0,019 ± 0,008	0,013 ± 0,006
Гістидин + Таурин Histidine + Taurine	0,031 ± 0,002	0,234 ± 0,034	0,230 ± 0,027
Триптофан Tryptophane	0,009 ± 0,008	0,244 ± 0,176	0,222 ± 0,010
Аланін + Аргінін Alanine + Arginine	0,282 ± 0,032	0,271 ± 0,030	0,257 ± 0,023
Пролін Proline	0,017 ± 0,004	0,299 ± 0,111*	0,296 ± 0,092*
Тирозин Thyrosine	0,056 ± 0,003	0,038 ± 0,002	0,034 ± 0,001
Валін Valine	0,053 ± 0,002	0,300 ± 0,011*	0,298 ± 0,010*
Метіонін Methionine	0,017 ± 0,001	0,026 ± 0,002	0,024 ± 0,001
Цистеїн Cysteine	0,018 ± 0,002	0,015 ± 0,001	0,016 ± 0,001
Ізолейцин Isoleucine	0,054 ± 0,004	0,082 ± 0,004	0,077 ± 0,021
Лейцин Leucine	0,159 ± 0,01	0,060 ± 0,014*	0,059 ± 0,022*
Фенілаланін Phenylalanine	0,077 ± 0,001	0,035 ± 0,011 *	0,054 ± 0,032*
Орнітин Ornithine	0,091 ± 0,008	0,233 ± 0,029*	0,199 ± 0,04*
Лізин Lysine	–	0,081 ± 0,023	0,080 ± 0,02

Примітка: * – відмінності значущі у порівнянні зі стандартним середовищем культивування, $p \leq 0,01$.

Note: * – the differences are statistically significant if compared the standard culture medium, $p \leq 0.01$.

amino acid composition, which is caused by the CGC presence.

As a result of studying the amino acid composition of media on day 5 of culturing there was found the absence of creatinine, serine, lysine in a standard medium.

In a standard medium (group 1) the content of glycine and leucine was higher than in culture medium

бластоцисти знаходиться у просвіті фалопієвих труб, при культивуванні *in vitro* – у синтетичних середовищах. Відсутність у середовищі культивування клітин материнського походження, очевидно, є причиною зменшення кількості життєздатних ембріонів. Тому система співкультивування на моношарі клітин КГК забезпечує максимальне наближення умов культивування до системи *in vivo* [4].

У яйцеводі, фолікулярній та матковій рідині знаходиться велика кількість вільних амінокислот, які є важливими для розвитку ембріонів, оскільки беруть участь у вуглеводному обміні, регулюванні осмотичного тиску, осмолярності та рН клітин [16, 17].

Д. Khan та співавт. [13] виявили, що КГК *in vitro* та *in vivo* утворюють цитоплазматичні містки, через які відбувається обмін низькомолекулярними речовинами. Це створює умову так званої «метаболічної кооперації».

Вважається, що КГК беруть участь у детоксикації живильного середовища шляхом хелатування іонів важких металів, знижують концентрацію речовин, які пригнічують розвиток ембріонів, секретують у середовище культивування амінокислоти та фактори росту, що стимулює розвиток ембріонів [18].

За результатами аналізу рівня пула амінокислот у середовищі культивування ми встановили, що в середовищах співкультивування рівень аспарагіну підвищується, а рівень гліцину та лейцину значуще зменшується.

Наші дані узгоджуються з результатами дослідження D. Brison [5] щодо кореляції між зменшенням рівня гліцину й лейцину в середовищах культивування, підвищенням рівня аспарагіну та збільшенням частоти настання клінічної вагітності. Аналогічні результати в процесі культивування кріоконсервованих ембріонів одержав R. Sturmeу [22].

Е. Seli та співавт. [21] встановили зв'язок між високим рівнем глутаміну в культуральному середовищі та клінічними показниками вагітності.

Н. Kattal та співавт. [12] розкривають причину різної якості ембріонів, які розвивалися на моношарі КГК. На думку авторів, у середовищі культивування L-глутамін розпадається з утворенням амонію, який є токсичним та негативно впливає на розвиток ембріона.

Для визначення ролі біохімічного оточення ембріонів в умовах співкультивування на свіжовиділених або кріоконсервованих КГК вважаємо доцільним дослідити інші «ембріотрофічні фактори», зокрема фактори росту.

Висновки

Співкультивування доімплантаційних ембріонів людини на моношарі свіжовиділених або кріоконсер-

in the presence of either fresh or cryopreserved CGC, indicating further utilization of amino acids by CGC.

The concentration of proline, ornithine and glutamine in the media with CGC increased, that could be due to the secretion of these amino acids (Table 4).

Of interest was the fact of increased concentration of essential amino acids, *i. e.* valine and tryptophan in the co-culturing media, since the level for all other essential amino acids decreased.

Serine, arginine, methionine, valine and leucine have been shown to be involved into the development of human embryos [8], therefore increasing the concentration of amino acids during co-culturing on either fresh or cryopreserved CGC positively influenced the development of embryos and their quality improves.

Essential and non-essential amino acids play a different role in development of embryos. Essential amino acids accelerate dividing the inner cell mass and increase the ability of post-implantation embryo developing [10]. Non-essential amino acids contribute to the embryo development from zygote to blastocyst, *i. e.* increase the number of trophoblast cells and enhance the blastocyst ability to hatch.

In humans the genome expression starts from eight cells, so the development of embryos during *in vitro* culturing often stops at this stage [14]. The development block during the embryonic genome activation is likely related with the terminated transcription and translation, slowing down of embryo metabolism. Human embryo up to the blastocyst stage is located in the lumen of fallopian tubes, while if *in vitro* cultured it is found in synthetic media. The absence in a culture medium of the cells of maternal origin is obviously the reason of reduced number of viable embryos. Therefore, the co-culturing on monolayer of the CGC ensures the maximum approaching to culturing *in vivo* [2].

In the oviduct, follicular and uterine fluids there is a large number of free amino acids, which are essential for embryonic development, as they are involved into carbohydrate metabolism, regulation of osmotic pressure, osmolarity and pH of the cells [15, 16].

D. Khan *et al.* [12] found that the CGC *in vitro* and *in vivo* formed cytoplasmic bridges through which the exchange of low molecular weight substances was performed. This creates the conditions for so-called 'metabolic cooperation'.

The CGC are believed to take part in detoxification of the nutritive medium by chelating the heavy metal ions, to reduce the concentration of substances inhibiting the embryonic development, to secrete amino acids into the culture medium and growth factors, that stimulates the development of embryos [17].

The analysis of a pool of amino acids in the culture medium enabled us to find out that in co-culturing media



вованих КГК яєчників людини сприяє розвитку ембріонів *in vitro*. Наявність цих клітин у середовищі культивування змінює його біохімічний профіль за рахунок підвищеного вмісту таких амінокислот, як триптофан, пролін, валін, орнітин, глутамін та лейцин.

Дані, отримані в нашій роботі, можуть мати практичну значущість для удосконалення системи культивування доімплантаційних ембріонів людини *in vitro* з метою оптимізації розвитку ембріонів, покращення їх морфологічних показників та збільшення частоти настання вагітності.

Література

1. Петрушко М.П., Піняєв В.І., Ревенко О.Б. та ін. Морфофункціональні характеристики свіжовиділених та криоконсервованих клітин гранульози та кумулюса яєчників людини // Проблемы криобиологии и криомедицины. – 2014. – Т. 25, №1. – С. 57–66.
2. Элленбоген А., Шалом-Пац Е., Аншина М.Б. Дозревание ооцитов *in vitro*. Показания, техника и результаты // Проблемы репродукции. – 2015. – Т. 21, №1. – С. 32–40.
3. Adjaye J., Huntriss J., Herwig R. et al. Primary differentiation in the human blastocyst: comparative molecular portraits of inner cell mass and trophectoderm cells // Stem Cells. – 2005. – Vol. 23, №10. – P. 1514–1525.
4. Aktan T., Gorkemli H., Gezginc K. et al. Improvement in embryo quality and pregnancy rates by using autologous cumulus body during ICSI cycles // J Turk. Ger. Gynecol. Assoc. – 2011. – Vol.12, №3. – P. 162–167.
5. Brison D.R., Houghton F.D. Identification of viable embryos in IVF by non-invasive measurement of amino acid turnover // Hum. Reprod. – 2004. – Vol. 19, №10. – P. 2319–2324.
6. Carrell D.T., Peterson C.M., Jones K.P. et al. A simplified coculture system using homologous, attached cumulus tissue results in improved human embryo morphology and pregnancy rates during *in vitro* fertilization // J. Assist. Reprod. Genet. – 1999. – Vol. 16, №7. – P. 344–349.
7. Fabbri R., Porcu E., Marsella T. et al. Human embryo development and pregnancies in an homologous granulosa cell coculture system // J. Assist. Reprod. Genet. – 2000. – Vol. 17, №1. – P. 1–12.
8. Gardner D.K., Schoolcraft W.B. Culture and transfer of human blastocyst // Curr. Opin. Obstet. Gynecol. – 1999. – Vol. 11, №3. – P. 307–311.
9. Houghton F., Hawkhead J., Humpherson P. et al. Non-invasive amino acid turnover predicts human embryo developmental capacity // Hum. Reprod. – 2002. – Vol. 18, №8. – P. 1756–1757.
10. Huang Z., Wells D. The human oocyte and cumulus cells relationship: new insights from the cumulus cell transcriptome // Mol. Hum. Reprod. – 2010. – Vol. 16, №10. – P. 715–725.
11. Hudson N.L., Berg M.C., Green M.P. et al. The microenvironment of the ovarian follicle in the postpartum dairy cow: effects on reagent transfer from cumulus cells to oocytes *in vitro* // Theor. Genet. – 2014. – Vol. 82, №4. – P. 563–573.
12. Kattal N., Cohen J., Barmat L. Role of coculture in human *in vitro* fertilization: a meta-analysis // Fertil. Steril. – 2008. – Vol. 90, №4. – P. 1069–1076.
13. Khan D., Guillemette C., Sirard M. et al. Transcriptomic analysis of cyclic AMP response in bovine cumulus cells // Physiol. Genomics. – 2015. – Vol. 47, №9. – P. 432–442.
14. Kuran M., Robinson J., Brown D. et al. Development, amino acid utilization and cell allocation in bovine embryos after in

the level of asparagine was increased and the one of glycine and leucine was significantly reduced.

Our findings are consistent with results reported by D. Brison [3] as for the correlation between the reduced levels of glycine and leucine in the culture medium, increased levels of asparagine and increased frequency of clinical pregnancy. Similar results were obtained by R. Sturmey when culturing the cryopreserved embryos [22].

E. Seli *et al.* [21] established a link between high levels of glutamine in the culture medium and clinical pregnancy rates.

N. Kattal *et al.* [11] revealed the cause of varying the quality of embryos which developed on monolayer of CGC. The authors believe that L-glutamine in the culture medium decomposes to form ammonia, which is toxic and affects the embryo development.

To determine the role of biochemical environment of embryos during co-culturing on either fresh or cryopreserved CGC it is expedient to discover other 'embryotrophic factors', in particular, growth factors.

Conclusions

Co-culturing of pre-implantation human embryos on monolayer of either fresh or cryopreserved ovarian KGC promotes human embryos *in vitro*. The presence of these cells in culture medium changes its biochemical profile due to a rising content of amino acids such as tryptophan, proline, valine, ornithine, glutamine and leucine.

The data obtained in our study may be of practical significance for improving the co-culturing protocols of pre-implantation human embryos *in vitro* to optimize the development of embryos, improving their morphological parameters and frequency of pregnancy.

References

1. Adjaye J., Huntriss J., Herwig R. et al. Primary differentiation in the human blastocyst: comparative molecular portraits of inner cell mass and trophectoderm cells. Stem Cells 2005; 23(10): 1514–1525.
2. Aktan T.M., Gorkemli H., Gezginc K. et al. Improvement in embryo quality and pregnancy rates by using autologous cumulus body during ICSI cycles. J Turk Ger Gynecol Assoc 2011; 12(3): 162–167.
3. Brison D.R., Houghton F.D. Identification of viable embryos in IVF by on-invasive measurement of amino acid turnover. Hum Reprod 2004; 19(10): 2319–2324.
4. Carrell D.T., Peterson C.M., Jones K.P. et al. A simplified coculture system using homologous, attached cumulus tissue results in improved human embryo morphology and pregnancy rates during *in vitro* fertilization. J Assist Reprod Genet 1999; 16(7): 344–349.
5. Ellenbogen A., Shalom-Paz E., Anshina M.B. Maturation of oocytes *in vitro*. Indications, techniques and results. Problemy Reproductologii 2015; 21(1): 32–40.



- vitro production in contrasting culture systems// *Reproduction*. – 2002. – Vol. 124, №3. – P. 155–165.
15. Latham K., Schultz R. Embryonic genome activation // *Front Biosci*. – 2001. – Vol. 1, №6. – P. 748–759.
 16. Leese H. J. The formation and function of oviduct fluid // *J. Reprod. Fert.* – 1988. – Vol. 82, №4. – P. 843–856.
 17. Li R., Whitworth K., Lai L. et al. Concentration and composition of free amino acids and osmolalities of porcine oviductal and uterine fluid and their effects on development of porcine IVF embryos // *Mol. Reprod. Dev.* – 2007. – Vol. 74, №9. – P. 1228–1235.
 18. McKiernan S., Clayton M., Bavister B. Analysis of stimulatory and inhibitory amino acids for development of hamster one-cell embryos in vitro // *Mol. Reprod. Dev.* – 1995. – Vol. 42, №2. – P. 188–199.
 19. Nagy Z., Varghese A., Agarwal A. Practical manual of in vitro fertilization: advanced methods and novel devices. Springer Science and Business Media, 2012. – 703 p.
 20. Protocol on embryo protection a working party of the 24th meeting of the Steering committee on bioethics of the Council of Europe; Report. – Strasbourg, 2003. – 44 p.
 21. Seli E., Botros L. Noninvasive metabolomic profiling of embryo culture media using proton nuclear magnetic correlates with reproductive potential of embryos in women undergoing in vitro fertilization // *Fertil. Steril.* – 2008. – Vol. 90, №6. – P. 2183–2189.
 22. Sturmey R.G., Hawkhead J.A. DNA damage and metabolic activity in the preimplantation embryo // *Hum. Reprod.* – 2009. – Vol. 24, №1. – P. 81–91.
 23. Zanoni M., Garagna S., Redi C. et al. The 2-cell block occurring during development of outbred mouse embryos is rescued by cytoplasmic factors present in inbred metaphase II oocytes // *Int. J. Dev. Biol.* – 2009. – Vol. 53, №1. – P. 129–134.
 6. Fabbri R., Porcu E., Marsella T. et al. Human embryo development and pregnancies in an homologous granulosa cell coculture system. *J Assist Reprod Genet* 2000; 17(1): 1–12.
 7. Gardner DK1, Schoolcraft WB. Culture and transfer of human blastocyst. *Curr Opin Obstet Gynecol* 1999 Jun; 11(3): 307–311.
 8. Houghton F., Hawkhead J., Humpherson P. et al. Non-invasive amino acid turnover predicts human embryo developmental capacity. *Hum Reprod* 2002; 18(8): 1756–1757.
 9. Huang Z., Wells D. The human oocyte and cumulus cells relationship: new insights from the cumulus cell transcriptome. *Mol. Hum. Reprod* 2010; 16(10): 715–725.
 10. Hudson N.L., Berg M.C., Green M.P. et al. The microenvironment of the ovarian follicle in the postpartum dairy cow: effects on reagent transfer from cumulus cells to oocytes in vitro. *Theriogenology* 2014; 82(4): 563–573.
 11. Kattal N, Cohen J, Barmat L. Role of coculture in human in vitro fertilization: a meta-analysis. *Fertil Steril.* 2008; 90(4): 1069–1076.
 12. Khan D., Guillemette C., Sirard M. et al. Transcriptomic analysis of cyclic AMP response in bovine cumulus cells. *Physiol Genomics* 2015; 47(9): 432–442.
 13. Kuran M., Robinson J., Brown D. et al. Development, amino acid utilization and cell allocation in bovine embryos after in vitro production in contrasting culture systems. *Reproduction* 2002; 124(3): 155–165.
 14. Latham K., Schultz R. Embryonic genome activation. *Front Biosci* 2001; (6): 748–759.
 15. Leese H.J. The formation and function of oviduct fluid. *J Reprod. Fert* 1988; 82(4): 843–856.
 16. Li R., Whitworth K., Lai L. et al. Concentration and composition of free amino acids and osmolalities of porcine oviductal and uterine fluid and their effects on development of porcine IVF embryos. *Mol Reprod Dev.* 2007; 74(9): 1228–1235.
 17. McKiernan S., Clayton M., Bavister B. Analysis of stimulatory and inhibitory amino acids for development of hamster one-cell embryos in vitro. *Mol. Reprod. Dev.* 1995; 42(2): 188–199.
 18. Nagy Z., Varghese A., Agarwal A. Practical manual of in vitro fertilization: advanced methods and novel devices. Springer Science & Business Media, 2012.
 19. Petrushko M.P., Pinayev V.I., Revenko O.B. et al. Morphofunctional characteristics of native and cryopreserved human ovarian granulosa and cumulus cells. *Problems of Cryobiology* 2014; 25(1): 57–66.
 20. Protocol on Embryo Protection A Working Party of the 24th Meeting of the Steering Committee on Bioethics of the Council of Europe; Report, Strasbourg, 2003.
 21. Seli E., Botros L. Noninvasive metabolomic profiling of embryo culture media using proton nuclear magnetic correlates with reproductive potential of embryos in women undergoing in vitro fertilization. *Fertil. Steril* 2008; 90(6): 2183–2189.
 22. Sturmey R.G., Hawkhead J.A. DNA damage and metabolic activity in the preimplantation embryo. *Hum Reprod* 2009; 24(1): 81–91.
 23. Zanoni M., Garagna S., Redi C. et al. The 2-cell block occurring during development of outbred mouse embryos is rescued by cytoplasmic factors present in inbred metaphase II oocytes. *Int J Dev Biol* 2009; 53(1): 129–134.

