



Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu
Wydział Medycyny Weterynaryjnej i Nauk o Zwierzętach

Mgr inż. Paulina Małgorzata Lipińska-Kranc

**Metabolizm energetyczny w oocytach i zarodkach
przedimplantacyjnych bydła**

Energy metabolism in bovine oocytes and preimplantation embryos

Rozprawa doktorska w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych

w dyscyplinie nauki biologiczne

Doctoral dissertation in the field of life science

in the discipline of biological sciences

Promotor:

Prof. UPP dr hab. Ewelina Warzych-Plejer

Katedra Genetyki i Podstaw Hodowli Zwierząt

Pracownia Biotechnologii Rozrodu

Poznań, 2025 rok

*Pragnę wyrazić najgłębsze podziękowania promotorowi mojej pracy, prof. UPP dr hab. **Ewelinie Warzych-Plejer**, za nieocenione wsparcie naukowe, życzliwość, cierpliwość oraz zaangażowanie na każdym etapie mojej drogi akademickiej. Dziękuję za poświęcony czas, cenne wskazówki i nieustanne motywowanie mnie do dalszego rozwoju.*

Specjalne podziękowania dla członków Pracowni Biotechnologii Rozrodu za wspólną pracę i nieocenione porady oparte na doświadczeniu.

Moim najbliższym, bez których ta praca by nie powstała – rodzicom Agnieszce i Mariuszowi, braciom Oskarowi i Jeremiemu, kochanemu mężowi Jakubowi oraz przyjaciółom, którzy kibicowali mi od początku i wspierali w trudnych momentach.

Spis publikacji składających się na rozprawę doktorską:

1. **Lipinska, P., Smits, K., Van Soom, A., Pavani, K. C., & Warzych, E. (2025).** Follicular fluid extracellular vesicles support energy metabolism of bovine oocytes, improving blastocyst development and quality†. *Biology of Reproduction*, ioaf096. <https://doi.org/10.1093/biolre/ioaf096>

Impact Factor 2-letni = 3,1

Impact Factor 5-letni = 3,7

Liczba punktów MNiSW = 200

2. **Lipinska, P., Pawlak, P., & Ewelina Warzych. (2023).** Species and embryo genome origin affect lipid droplets in preimplantation embryos. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 11. <https://doi.org/10.3389/fcell.2023.1187832>

Impact Factor 2-letni = 4,6

Impact Factor 5-letni = 5,2

Liczba punktów MNiSW = 100

Źródła finansowania badań

1. Zadanie badawcze dla Młodych Naukowców (2021) pt. „**Jakościowa i ilościowa charakterystyka kropli lipidowych w uni- i biparentalnych, przedimplantacyjnych zarodkach bydła i świni hodowanych *in vitro***” (eksperyment 2).
2. Zadanie badawcze dla Młodych Naukowców (2022) pt. „**Wpływ follikulosomów na jakość i gospodarkę lipidową dojrzewających kompleksów oocyt-cumulus**” (eksperyment 1).
3. Grant Erasmus+ - pokrycie kosztów stażu naukowego w Ghent University.
4. Fundusz statutowy Wydziału Medycyny Weterynaryjnej i Nauk o Zwierzętach Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu nr 506.534.05.00 i 506.534.09.00.
5. Publikację nr 1 (koszty publikowania w otwartym dostępie) dofinansowano ze środków Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego w ramach Strategii Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu w latach 2024-2026 w zakresie doskonalenia badań naukowych i prac rozwojowych w priorytetowych obszarach badawczych.
6. Publikację nr 2 (koszty publikowania w otwartym dostępie) dofinansowano ze środków Towarzystwa Biologii Rozrodu.

Spis treści

Zastosowane skróty	7
Streszczenie	9
Abstract	10
1. Wstęp.....	11
1.1. Pęcherzyk jajnikowy – środowisko wzrostu i dojrzewania oocytu.....	12
1.2. Pęcherzyki zewnątrzkomórkowe i ich rola w środowisku pęcherzyka jajnikowego	16
1.3. Podstawowe szlaki metabolizmu energetycznego	18
1.3.1. Glukoza jako źródło energii	19
1.3.2. Lipidy jako źródło energii	20
1.4. Metabolizm energetyczny w obrębie pęcherzyka jajnikowego	23
1.5. Metabolizm energetyczny podczas rozwoju zarodkowego	26
2. Hipoteza i cele pracy	29
3. Materiały i metody	30
3.1. Materiał badawczy	30
3.2. Metody badawcze.....	30
3.2.1. Eksperyment nr 1	30
3.2.2. Eksperyment nr 2.....	40
4. Wyniki.....	45
4.1. Eksperyment 1	45
4.2. Eksperyment 2	50
4.3. Wykaz prac przeprowadzonych przez doktorantkę.....	56
5. Dyskusja	57
5.1. Charakterystyka follikulosomów i ich transport w obrębie kompleksu oocyt-cumulus	57
5.2. Rola follikulosomów w metabolizmie COC	59
5.3. Rola follikulosomów w odpowiedzi COC na warunku stresu metabolicznego	61

5.4. Charakterystyka kropli lipidowych podczas rozwoju przedimplantacyjnego zarodków bydła.....	65
5.5. Wpływ obecności/braku materiału genetycznego ojcowskiego na charakterystykę kropli lipidowych zarodków przedimplantacyjnych	66
5.6. Różnice międzygatunkowe w charakterystyce kropli lipidowych zarodków przedimplantacyjnych	68
5.7. Blastocysta – parametry lipidowe i markery jakościowe	69
6. Podsumowanie dyskusji i wnioski	71
Bibliografia.....	75
Spis figur i tabel	95

Zastosowane skróty (w porządku alfabetycznym)

ACACA – syntaza karboksylazy acetylo-CoA (ang. *Acetyl-CoA Carboxylase Alpha*)
b.IVF - grupa zarodków bydłych pochodzenia *in vitro*
b.PA - grupa zarodków bydłych pochodzenia partenogenetycznego
cAMP – cykliczny adenozynomonofosforan (ang. *cyclic Adenosine Monophosphate*)
CD63 – białko błonowe CD63
CD9 – białko błonowe CD9
CDX2 – czynniki transkrypcyjne z rodziny CDX (ang. *Caudal-related homeobox 2*)
CE – Estry cholesterolu (ang. *Cholesteryl esters*)
cGMP – cykliczny guanozynomonofosforan (ang. *cyclic Guanosine Monophosphate*)
COC - kompleks oocyt-cumulus (ang. *cumulus-oocyte complex*)
CON – grupa kontrolna
CON+ - grupa kontrolna suplementowana follikulosomami
EGA - aktywacja genomu zarodka (ang. *embryo genome activation*)
ER - retikulum endoplazmatyczne
ETO - grupa inhibicji metabolizmu kwasów tłuszczowych
ETO+ - grupa inhibicji metabolizmu kwasów tłuszczowych suplementowana follikulosomami
EVs - pęcherzyki zewnątrzkomórkowe (ang. *extracellular vesicles*)
FA - kwasy tłuszczowe (ang. *fatty acids*)
FAO - utlenianie kwasów tłuszczowych (ang. *fatty acid oxidation*)
FASN – syntaza kwasów tłuszczowych (ang. *Fatty Acid Synthase*)
FF-EVs - follikulosomy (ang. *follicular fluid derived extracellular vesicles*)
GAPDH – dehydrogenaza aldehydu 3-fosfoglicerynowego (ang. *Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase*)
GDF9 – czynnik różnicowania wzrostu 9 (ang. *Growth Differentiation Factor 9*)
GLUT1 – transporter glukozy typu 1 (ang. *Glucose Transporter Type 1*)
GV – stadium pęcherzyka przedowulacyjnego z widocznym jądrem (ang. *Germinal Vesicle*)
HSP70 – białko szoku cieplnego 70 (ang. *Heat Shock Protein 70*)
ICM – węzeł zarodkowy (ang. *Inner Cell Mass*)
IODH - grupa inhibicji metabolizmu glukozy
IODH+ - grupa inhibicji metabolizmu glukozy suplementowana follikulosomami
IVF - zapłodnienie pozaustrojowe (ang. *in vitro fertilization*)
IVM - dojrzewanie oocytów *in vitro* (ang. *in vitro maturation*)

IVP - produkcja zarodków metodą *in vitro* (ang. *in vitro production*)

LD - krople lipidowe (ang. *lipid droplets*)

MI - stadium metafazy I mejozy

MII – stadium metafazy II mejozy

NEB - Ujemny Bilans Energetyczny (ang. *Negative Energy Balance*)

NEFA - niezestryfikowane kwasy tłuszczowe (ang. *non-esterified fatty acids*)

NTA - Nanoparticle Tracking Analysis

OCT4 – czynnik transkrypcyjny OCT4 (ang. *Octamer-binding Transcription Factor 4*)

p.PA - grupa zarodków świni pochodzenia partenogenetycznego

PA - aktywacja partenogenetyczna (ang. *parthenogenetic activation*)

PC – Fosfatydylocholina (ang. *Phosphatidylcholine*)

PE – Fosfatydyloetanolamina (ang. *Phosphatidylethanolamine*)

PG – Fosfatydyloglicerol (ang. *Phosphatidylglycerol*)

PI – Fosfatydyloinozytol (ang. *Phosphatidylinositol*)

PLIN2 – perilipina 2 (ang. *Perilipin 2*)

PPARA – receptor aktywowany przez proliferatory peroksysomów alfa (ang. *Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Alpha*)

PPARA γ – receptor aktywowany przez proliferatory peroksysomów gamma (ang. *Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma*)

PPP - szlak pentozofosforanowy (ang. *Pentose Phosphate Pathway*)

PS – Fosfatydyloseryna (ang. *Phosphatidylserine*)

SLC2A4 – transporter glukozy typu 4 (ang. *Solute Carrier Family 2 Member*)

SM – Sfingomielina (ang. *Sphingomyelin*)

TE – trofektoderma (ang. *Trophectoderm*)

TEM - Transmisyjny Mikroskop Elektronowy (ang. *transmission electron microscope*)

TG – Triacyloglicerole (ang. *Triacylglycerols*)

TSG101 – białko podatności guza 101

TZPs - połączenia trans-zonalne (ang. *trans-zonal projections*)

WB - Western Blot

YWHAZ – białko z rodziny 14-3-3 zeta/delta (ang. *Tyrosine 3-Monooxygenase/Tryptophan 5-Monooxygenase Activation Protein Zeta*)

Streszczenie

Metabolizm energetyczny to ogół procesów biochemicznych, dzięki którym wszelkie komórki uzyskują energię niezbędną do prawidłowego funkcjonowania. Tyczy się to również oocytów oraz zarodków, w których homeostaza energetyczna stanowi podstawę ich wysokiej kompetencji rozwojowej. Elementem mogącym częściowo regulować metabolizm w obrębie pęcherzyka jajnikowego są follikulosomy – pęcherzyki zewnątrzkomórkowe wnikające do oocytów i modulujące ich ścieżki metaboliczne. Również w zarodkach obserwowane są istotne zmiany w pozyskiwaniu i wykorzystywaniu energii na kolejnych etapach rozwoju przedimplantacyjnego, stąd prowadzone są badania określające wpływ różnych czynników na parametry metabolizmu energetycznego. Niniejsza praca doktorska obejmuje dwa eksperymenty skoncentrowane na wybranych aspektach metabolizmu energetycznego: (1) podczas dojrzewania *in vitro* oocytów oraz (2) na kolejnych etapach rozwoju przedimplantacyjnego zarodków bydlęcych.

W pierwszym eksperymencie scharakteryzowano follikulosomy jako elementy komunikacji międzykomórkowej w pęcherzyku jajnikowym oraz oceniono ich wpływ na oocyty dojrzewające w warunkach fizjologicznych i zaburzonego metabolizmu. Wykazano, że follikulosomy transportowane są do wnętrza oocytu poprzez połączenia transzonalne, a ich pobór przez komórki pęcherzykowe nasila się przy zaburzeniach metabolicznych. Suplementacja pożywki do dojrzewania *in vitro* follikulosomami (w warunkach fizjologicznych jak i zaburzonego metabolizmu) istotnie poprawiała wskaźniki skuteczności hodowli oraz korzystnie wpływała na profil lipidomiczny zarodków. Efekty tej suplementacji były również widoczne na poziomie ekspresji mRNA oraz w charakterystyce kropli lipidowych w kompleksach oocyt-cumulus.

W drugim eksperymencie scharakteryzowano parametry kropli lipidowych zarodków bydlęcych na kolejnych etapach rozwoju przedimplantacyjnego od zygoty do stadium blastocysty. Analizy wykazały, że parametry kropli lipidowych dynamicznie zmieniają się w trakcie kolejnych etapów rozwoju przedimplantacyjnego. W zarodkach bydlęcych największy spadek parametrów lipidowych zaobserwowano w stadium 8-16 komórek, kiedy aktywowany jest genom zarodka. Parametry lipidowe wykazały cechy specyficzne gatunkowo (bydło vs świnia) - rozmiar kropli lipidowych świni był istotnie większy w każdym stadium rozwojowym, a liczba kropli mniejsza w porównaniu do bydła. Ponadto wykazano wpływ obecności gamety męskiej (zapłodnienie *in vitro* vs partenogeneza). Szczególnie istotne różnice między zarodkami *in vitro* i partenogenetycznymi odnotowano w kluczowych stadiach rozwoju, takich jak 8–16 komórek i blastocysta.

Uzyskane wyniki po raz pierwszy opisują follikulosomy jako cząsteczki zdolne do kompensowania deficytów powstałych w kompleksach oocyt-cumulus na skutek dojrzewania w warunkach zaburzonego metabolizmu energetycznego. Dodatkowo, zaobserwowano gatunkowo specyficzny wzorzec zmian parametrów kropli lipidowych w kolejnych stadiach rozwoju przedimplantacyjnego zarodka, który może stanowić czuły wskaźnik jego jakości i potencjału rozwojowego.

Abstract

Energy metabolism encompasses all biochemical processes by which cells obtain the energy necessary for proper functioning. This also applies to oocytes and embryos, in which energy homeostasis is fundamental to their high developmental competence. One of the regulatory elements of metabolism within the ovarian follicle are folliculosomes - extracellular vesicles that penetrate oocytes and modulate their metabolic pathways. Significant changes in energy acquisition and utilization are also observed in embryos at successive stages of preimplantation development. Therefore, research is being conducted to determine the effects of various factors on parameters of energy metabolism. This doctoral dissertation comprises two experiments focused on selected aspects of energy metabolism: (1) during in vitro maturation of oocytes, and (2) at subsequent stages of preimplantation development in bovine embryos.

In the first experiment, folliculosomes were characterized as elements of intercellular communication within the ovarian follicle, and their effect on oocytes maturing under physiological and metabolically compromised conditions was assessed. It was demonstrated that folliculosomes are transported into the oocyte via transzonal projections, and their uptake by follicular cells increases under metabolic stress. Supplementation of the IVM medium with folliculosomes (under both physiological and altered metabolic conditions) significantly improved culture quality parameters and positively influenced the lipidomic profile of the resulting embryos. These effects were also observed at the mRNA expression level and in the characterization of lipid droplets within the oocyte–cumulus complexes.

In the second experiment, lipid droplet parameters of bovine embryos were characterized at various stages of preimplantation development, from the zygote to the blastocyst stage. The analyses revealed that lipid droplet parameters undergo dynamic changes throughout preimplantation development. In bovine embryos, the most pronounced decline in lipid parameters was observed at the 8–16 cell stage, coinciding with embryonic genome activation. Lipid droplet parameters displayed species-specific features (cattle vs. pig): pig embryos had significantly larger lipid droplets at each developmental stage, but fewer droplets compared to cattle. Moreover, the presence of the male gamete (in vitro fertilization vs. parthenogenesis) was shown to influence these parameters. Particularly significant differences between IVF and parthenogenetic embryos were noted at key developmental stages, such as the 8–16 cell stage and blastocyst.

The obtained results describe, for the first time, folliculosomes as vesicles capable of compensating for deficits in oocyte–cumulus complexes caused by maturation under compromised energy metabolism. Additionally, a species-specific pattern of lipid droplet parameter changes was observed across preimplantation stages, which may serve as a sensitive indicator of embryo quality and developmental potential.

1. Wstęp

W ostatnich dekadach dokonano znaczącego postępu w technologiach wspomaganego rozrodu, wykorzystywanych zarówno w leczeniu niepłodności u ludzi, jak i w hodowli zwierząt oraz ochronie materiału genetycznego cennych lub zagrożonych gatunków. U zwierząt gospodarskich początkowo najpowszechniej stosowaną metodą było sztuczne unasiennianie, które zrewolucjonizowało hodowlę bydła w XX wieku. Następnie wprowadzono szereg innowacji, takich jak kriokonserwacja nasienia, transfer zarodków czy pozyskiwanie zarodków poprzez zapłodnienie pozaustrojowe, które znacząco wpłynęły na efektywność reprodukcji (Moore & Hasler, 2017). Zgodnie z danymi International Embryo Transfer Society (IETS), produkcja zarodków bydlęcych metodą *in vitro* (IVP) wykazuje stały, średni roczny wzrost na poziomie 12%. W ostatnich latach IETS odnotowało rocznie ponad 400 tysięcy transferów zarodków pozyskiwanych pozaustrojowo. Obserwowane tendencje wskazują zatem na zmiany w praktykach hodowlanych, polegające na uzupełnianiu tradycyjnych metod rozrodu zwierząt nowoczesnymi technologiami *in vitro* (Ferre et al. 2019).

Pomimo wzrastającego udziału produkcji zarodków *in vitro* na świecie, wciąż istnieją elementy tego procesu, które wymagają dalszych optymalizacji. W odniesieniu do różnych gatunków zwierząt hodowlanych, średni odsetek blastocyst uzyskiwanych pozaustrojowo pozostaje poniżej oczekiwań i wynosi 20 – 40% u bydła oraz koni, a 30 – 50% u trzody chlewnej (Niemann H., Wrenzycki Ch. 2018). Niezadowalające rezultaty są spowodowane wieloma ograniczeniami. W literaturze najczęściej wspomina się o obniżonej jakości oocyту, wynikającej z niekompletnego dojrzewania cytoplazmatycznego, fragmentacji DNA i nieodpowiednich warunków hodowli, które zaburzają między innymi aktywację genomu zarodka (Ferre et al. 2019). Ogólnie przyjmuje się, że zarodki uzyskane metodą *in vitro* są gorszej jakości niż te powstałe *in vivo*, co ocenia się na podstawie ich morfologii, zdolności do kriokonserwacji, profilu ekspresji genów oraz wskaźników ciąży po transferze (Lonergan & Fair, 2015).

Jednym z elementów procedury IVP, który podlega ciągłemu doskonaleniu, jest etap dojrzewania oocytów *in vitro* (IVM). Wśród najczęściej opisywanych ograniczeń IVM wymienia się skład pożywki, który nie odzwierciedla w pełni optymalnych warunków *in vivo* (Telfer et al. 2020). Zapewnienie odpowiedniego środowiska dla dojrzewania oocytów staje się ważnym celem naukowym, gdyż sukces procedury wynika przede wszystkim z trafnego odtworzenia naturalnych interakcji ze środowiskiem, co prowadzi do właściwej aktywacji

procesów metabolicznych, np. produkcji energii. Badania wskazują również, iż elementy komunikacji międzykomórkowej, takie jak pęcherzyki zewnątrzkomórkowe (EVs, *ang. extracellular vesicles*), są potencjalnie kluczowymi mediatorami, które mogą regulować homeostazę i wpływać na jakość oraz przeżywalność oocytów i zarodków (Gebremedhn et al. 2020; Benedetti et al. 2024).

Badania nad molekularnymi czy metabolicznymi aspektami dojrzewania oocytów i wczesnego rozwoju zarodkowego u ssaków są kluczowe dla zrozumienia fundamentalnych procesów biologicznych leżących u podstaw sukcesu reprodukcyjnego. W ostatnim czasie obserwuje się rosnące zainteresowanie bydłowymi modelami *in vitro* oraz przedimplantacyjnym rozwojem zarodków bydła. Modele te wykorzystywane są do pogłębionych badań nad technikami wspomaganego rozrodu człowieka ze względu na liczne fizjologiczne podobieństwa, takie jak długość folikulogenezy, pojedyncza owulacja, zawartość lipidów w oocytach, czy przemiany metaboliczne w zarodkach. Zaletą modeli zwierzęcych jest brak kontrowersji etycznych, gdyż materiał biologiczny może być pozyskiwany z jajników pochodzących z rzeźni komercyjnych (Langbeen et al. 2015).

1.1. Pęcherzyk jajnikowy – środowisko wzrostu i dojrzewania oocytu

Kształtowanie jakości oocytów i powstałych dalej zarodków to proces wieloetapowy, którego droga niewątpliwie rozpoczyna się już w czasie życia płodowego samicy. Wówczas dochodzi do powstawania zawiązków jajników, a w nich pęcherzyków jajnikowych. Główną rolę pęcherzyka jajnikowego jest zapewnienie odpowiednich warunków dla wzrostu i dojrzewania oocytu oraz jego uwolnienie w procesie owulacji (Krzymowski, 2007).

Rozwój pęcherzyków jajnikowych (folikulogeneza) rozpoczyna się od stadium pęcherzyka pierwotnego, który zawiera oocyt otoczony pojedynczą warstwą płaskich komórek ziarnistych. Pęcherzyk pierwotny przekształca się w pęcherzyk pierwszorzędowy (I-rzędowy), w którym komórki ziarniste przybierają kształt sześcienny i zaczynają proliferować. Oocyt zwiększa średnicę, a wokół niego tworzy się osłonka przejrzysta. Następnie powstaje pęcherzyk drugorzędowy (preantralny, II-rzędowy), charakteryzujący się wielowarstwowym nabłonkiem ziarnistym oraz pojawieniem się komórek osłonki wewnętrznej i zewnętrznej. Pomiedzy warstwami zaczynają się tworzyć przestrzenie wypełnione płynem. W kolejnej fazie pęcherzyk przechodzi w stadium trzeciorzędowe (antralne), w którym pojawia się dobrze widoczna jamka

(antrum) wypełniona płynem pęcherzykowym. Antralny pęcherzyk otoczony jest z zewnątrz osłonką zewnętrzną (zbudowaną z mięśni gładkich, fibroblastów, kolagenu i naczyń) oraz osłonką wewnętrzną, która zawiera komórki steroidogenne i naczynia krwionośne. Osłonka wewnętrzna sąsiaduje z błoną podstawną, która stanowi barierę pomiędzy krwią a wnętrzem pęcherzyka. Wewnątrz pęcherzyka znajdują się komórki ziarniste (pęcherzykowe). Bezpośrednio otaczające oocyt komórki pęcherzykowe tworzą tzw. wieniec promienisty, który wraz z oocytem tworzy wzgórek jajonośny (Fig. 1). Oocyt z otaczającymi go komórkami pęcherzykowymi nazywany jest kompleksem oocyt-cumulus (COC, ang. cumulus-oocyte complex) (Popiołek & Grzesiak, 2019).

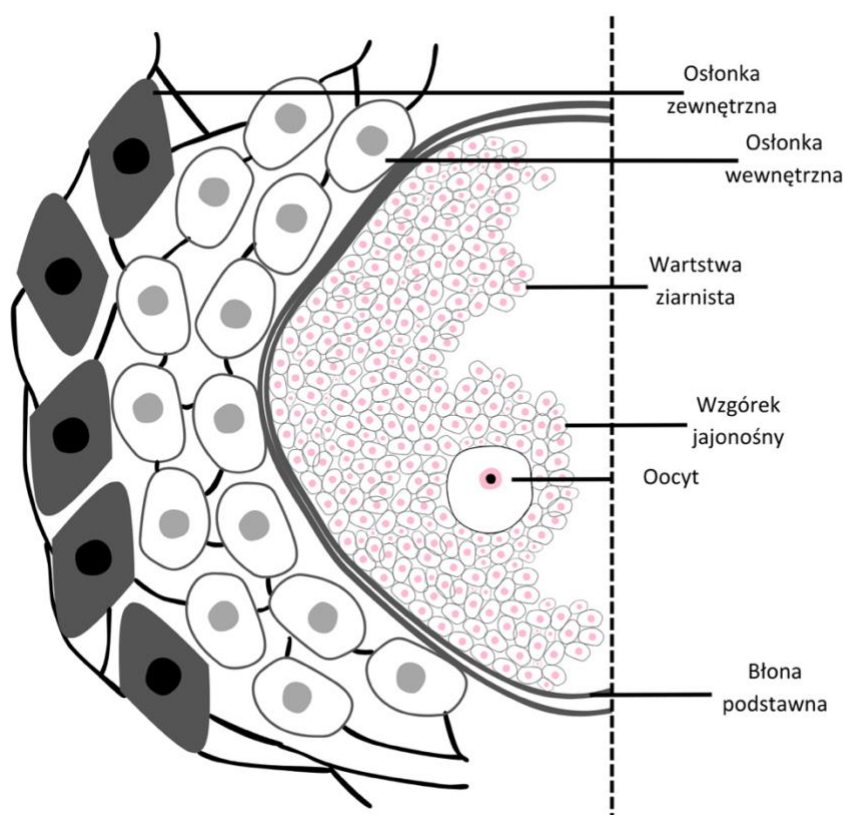


Fig. 1. Uproszczony schemat budowy pęcherzyka jajnikowego (grafika własna).

Najbardziej zaawansowanym stadium rozwoju jest pęcherzyk przedowulacyjny, zdolny do pęknięcia i uwolnienia oocyta podczas owulacji (Popiołek & Grzesiak, 2019). W jajnikach samic dojrzałych płciowo można zaobserwować pęcherzyki we wszystkich fazach rozwoju. Niemniej jednak nie wszystkie pęcherzyki antralne będą w stanie rozwijać się w trakcie cyklu płciowego, ponieważ większość z nich będzie podlegała procesowi atrezji. Jedynie w obecności hormonu folikulotropowego rosnący pęcherzyk może jej uniknąć i zostać włączonym do kohorty rozwijających się pęcherzyków antralnych. Całkowity czas rozwoju od pęcherzyka pierwotnego do owulacyjnego u krów szacuje się na 180 dni. Natomiast wzrost od wczesnego

stadium antralnego do owulacyjnego zajmuje około 42 dni (Lussier et al. 1987). Dla porównania średni całkowity czas rozwoju pęcherzyków szacuje się na 20 dni u myszy, 184 dni u owiec oraz 205 dni u ludzi (Cortvrindt & Smitz, 2001).

Wraz ze wzrostem pęcherzyka jajnikowego postępuje rozwój oocyty, który stopniowo nabywa pełną kompetencję do zapłodnienia oraz dalszego rozwoju w prawidłowy organizm. Oocyty w pęcherzykach preantralnych przechodzą intensywny etap wzrostu, któremu towarzyszy znaczące zwiększenie ich objętości. U myszy proces ten skutkuje aż 34-krotnym wzrostem objętości komórki. W tym okresie oocyty gromadzą kluczowe zasoby niezbędne do późniejszego dojrzewania, zapłodnienia oraz rozwoju zarodka przedimplantacyjnego. Jednym z charakterystycznych elementów tej fazy jest rozpoczęcie syntezy i wydzielania glikoprotein tworzących osłonkę przejrzystą (Eppig et al. 1996). Ostatecznym etapem przygotowywania oocytów do ewentualnego zapłodnienia jest proces dojrzewania, który w warunkach *in vivo* u większości ssaków ma miejsce w okresie okołoowulacyjnym. Dojrzewanie oocyty jest złożonym procesem obejmującym przede wszystkim dojrzewanie jądrowe i cytoplazmatyczne. Dojrzewanie jądrowe dotyczy przemian w jądrze komórkowym, takich jak kondensacja chromatyny, formowanie wrzeciona kariokinetycznego, separacja chromosomów, wyrzut pierwszego ciała kierunkowego, a także zatrzymanie podziału mejozytycznego w stadium metafazy II. Dojrzewanie cytoplazmatyczne to proces, który umożliwia zakończenie dojrzewania jądrowego, przeprowadzenie zapłodnienia oraz rozpoczęcie wczesnych etapów rozwoju zarodkowego, stanowiąc tym samym fundament dla implantacji zarodka, rozpoczęcia ciąży i prawidłowego rozwoju płodu (Watson, 2007). Proces ten wiąże się z istotnymi zmianami strukturalnymi i funkcjonalnymi, obejmującymi m.in. reorganizację mitochondriów, ziaren korowych oraz retikulum endoplazmatycznego. Równolegle zachodzi intensywna synteza mRNA i białek w oocycie, ekspansja komórek wieńca promienistego oraz osłabienie ich połączeń z oocytem, co sprzyja przygotowaniu oocyty do zapłodnienia i dalszego rozwoju (Rosario et al. 2011). Prawidłowe rozmieszczenie organelli jest wysoce istotne. Jak wykazano, oocyty o niższej jakości nie są zdolne do prawidłowej redystrybucji mitochondriów podczas dojrzewania, co skutkuje obniżeniem poziomu ATP i ograniczoną kompetencją rozwojową, szczególnie na etapie formowania blastocysty (Stojkovic et al. 2001).

Prawidłowy rozwój oocytów zależy również od kontaktu i komunikacji z sąsiadującymi komórkami somatycznymi, które zapewniają wsparcie metaboliczne oraz przekazują liczne sygnały regulacyjne. Ten kontakt odbywa się za pośrednictwem cienkich wypustek cytoplazmatycznych, które wychodzą z komórek pęcherzykowych otaczających oocyt,

przechodzą przez osłonkę przejrzystą znajdującą się między nimi i docierają do powierzchni oocytu. Wypustki komórek pęcherzykowych określa się jako połączenia trans-zonalne (TZPs, ang. trans-zonal projections). Liczba TZPs wzrasta wraz ze wzrostem oocytu, a w momencie owulacji struktury te szybko zanikają, co prowadzi do trwałego zerwania kontaktu między komórką rozrodczą a otaczającymi ją komórkami somatycznymi (Clarke, 2022).

Niedawne badania prowadzone na trójwymiarowym modelu mysim z użyciem nowoczesnej mikroskopii elektronowej wykazały, że większość TZPs rozgałęzia się i tworzy połączenia szczelinowe między sobą, zamiast bezpośrednio docierać do oocytu. Średnio każda komórka wieńca promienistego tworzy około 30 TZPs, które nie sięgają powierzchni oocytu oraz około 9 TZPs, które docierają do oocytu. Długości połączonych TZPs są o około 4 μm większe niż średnia grubość osłonki przejrzystej, co umożliwia im rozciąganie się wzdłuż powierzchni oocytu lub nawet powrót w kierunku osłonki. Odkrycia te ukazują złożoność i zawartość struktury TZPs (Beana & Terasaki, 2019). Przez długi czas uważano, że wsparcie fizjologiczne zapewniane przez komórki wieńca promienistego za pośrednictwem TZPs ogranicza się do małych cząsteczek (≤ 1 kDa), które mogą przenikać przez połączenia. Jednakże wykazano, że większe ładunki, takie jak długie cząsteczki RNA i lipidy, również mogą być przekazywane z komórek wieńca promienistego do oocytu. Uważa się, że proces ten może zachodzić za pośrednictwem pęcherzyków zewnątrzkomórkowych. TZPs mogą uwalniać pęcherzyki, które następnie łączą się z oocytem, co zostało wykazane za pomocą mikroskopii elektronowej (Macaulay et al. 2014, Clarke, 2022).

Innym typem połączeń międzykomórkowych, obserwowanym zarówno pomiędzy komórkami ziarnistymi otaczającymi oocyt, jak i pomiędzy komórkami ziarnistymi a samym oocytem, są tzw. połączenia szczelinowe (ang. *gap junctions*) (Marchais et al. 2022). Połączenia szczelinowe są jedną z najlepiej przebadanych form komunikacji międzykomórkowej w jajniku ssaków. Znajdują się one na końcach połączeń trans-zonalnych, które kontaktują się z błoną komórkową oocytu. Zbudowane są z białek transbłonowych o wielu domenach określanych jako koneksyny. W kompleksie oocyt-cumulus szczególnie ważne są dwie koneksyny: CX43 oraz CX37. Powszechnie uważa się, że biorą one udział w komunikacji między różnymi typami komórek: CX43 w komunikacji między komórkami pęcherzykowymi, a CX37 w komunikacji między komórkami pęcherzykowymi a oocytem (Xie et al. 2021). Połączenia szczelinowe umożliwiają wymianę jonów, wtórnych przekaźników sygnałowych oraz małych metabolitów (np. glukozy) (Mese et al. 2007).

Odpowiednio zorganizowane środowisko wewnątrzpęcherzykowe stanowi kluczowy element w procesie dojrzewania oocytów i opiera się na ścisłej interakcji pomiędzy oocytem, komórkami pęcherzykowymi oraz płynem pęcherzykowym (Dumesic et al. 2015). Płyn pęcherzykowy pełni funkcję naturalnego mikrośrodowiska, w którym oocyt rozwija się i dojrzewa. Wywodzi się z dwóch głównych źródeł: z przesącza osocza naczyń włosowatych warstwy osłonki pęcherzyka zlokalizowanej w korowej części jajnika oraz z substancji wydzielanych przez warstwy komórek ziarnistych. Zawiera złożoną mieszaninę jonów, białek, metabolitów, hormonów, lipidów, substratów energetycznych oraz reaktywnych form tlenu (Andrande et al. 2019). To zróżnicowane spektrum cząsteczek wskazuje, że płyn pęcherzykowy pełni funkcję nie tylko rezerwuaru, lecz również aktywnego środowiska metabolicznego, wywierającego istotny wpływ na komórki pęcherzykowe oraz oocyt. Przykładem są kwasy tłuszczowe obecne w płynie pęcherzykowym, które są wchłaniane przez oocyt i wpływają na jego dojrzewanie oraz jakość. Zaburzenia homeostazy wewnątrz pęcherzyka, przejawiające się podwyższonym stężeniem kwasów tłuszczowych, mogą prowadzić do zakłócenia dojrzewania jądrowego oocytu oraz obniżenia jego kompetencji rozwojowej, co przekłada się na zmniejszony potencjał rozwojowy powstałych z niego blastocyst (Shi & Sirard, 2022).

Od najwcześniejszych etapów folikulogenezy zachodzi dynamiczna wymiana sygnałów w obrębie pęcherzyka. Szczególnie istotną rolę odgrywa komunikacja na krótkie odległości, realizowana przez połączenia trans-zonalne, które uczestniczą m.in. w regulacji stężenia wtórnych przekaźników cAMP i cGMP w oocycie, co wpływa na zatrzymanie lub wznowienie mejozy (Marchais et al. 2022). Jednakże w ostatnim czasie zidentyfikowano nowe mechanizmy komunikacji w mikrośrodowisku pęcherzyka, umożliwiające wymianę dużych cząsteczek – takich jak kwasy nukleinowe, białka i lipidy – pomiędzy elementami pęcherzyka jajnikowego (płynem pęcherzykowym a komórkami pęcherzykowymi i komórkami pęcherzykowymi a oocytem). Komunikacja ta realizowana jest za pośrednictwem pęcherzyków zewnątrzkomórkowych (EVs) i została już powiązana z regulacją rozwoju pęcherzyka, wzrostem oocytu oraz jego jakością zarówno u ludzi jak i u zwierząt (Andrande et al. 2019).

1.2. Pęcherzyki zewnątrzkomórkowe i ich rola w środowisku pęcherzyka jajnikowego

Wśród różnych czynników zaangażowanych w proces wzrostu i dojrzewania oocytu oraz ich wpływu na jakość zarodka coraz większe zainteresowanie naukowe wzbudzają zewnątrzkomórkowe pęcherzyki pochodzące z płynu pęcherzykowego.

Według aktualnej definicji opublikowanej przez ISEV (International Society for Extracellular Vesicles) termin „extracellular vesicles” (EVs) odnosi się do cząstek uwalnianych z komórek, otoczonych dwuwarstwą lipidową i nie mogących replikować samodzielnie (tj. nie zawierają funkcjonalnego jądra) (Welsh et al. 2024). EVs mogą być wydzielane przez różne typy komórek i zostały wykryte m.in. w osoczu, moczu, nasieniu, ślinie, mleku, surowicy, łzach, limfie, płynie mózgowo-rdzeniowym, płynie jamy blastocysty oraz płynie pęcherzykowym (Doyle & Wang, 2019).

Różne typy EVs zostały sklasyfikowane w oparciu o ich pochodzenie i mechanizmy biogenezy. Znany jest podział na co najmniej trzy główne źródła: EVs apoptotyczne (określane jako ciała i pęcherzyki apoptotyczne) powstają w wyniku fragmentacji komórek poddawanych apoptozie; ektosomy (mikropęcherzyki/mikrocząsteczki) powstają poprzez bezpośrednie zewnętrzne pęczkowanie błony plazmatycznej; egzosomy, które powstają poprzez wewnętrzne pęczkowanie przedziałów endosomalnych, które następnie ulegają fuzji z błoną plazmatyczną (Jeppesen et al. 2023). Egzosomy są uważane za specyficzną populację EVs i charakteryzują się średnicą 30–150 nm. Zawierają ewolucyjnie konserwatywny zestaw białek, w tym tetraspiny, Alix, CD63, CD9, HSP70, określane jako „białka markerowe egzosomów” (Borges et al. 2013). W odpowiedzi na różnorodność typów EVs i niepewność dotyczącą ich biogenezy w wielu przypadkach, ISEV przyjęło pragmatyczne podejście, klasyfikując EVs jako „duże EVs” (>200 nm) lub „małe EVs” (<200 nm) (Welsh et al. 2024).

Początkowo przypuszczano, że EVs służą komórkom jako mechanizm pozbywania się zbędnych materiałów, wspierając tym samym homeostazę tkanek. Obecnie wiadomo jednak, że EVs pełnią kluczowe funkcje w komunikacji międzykomórkowej, umożliwiając przekazywanie swojego ładunku (białka, lipidy i kwasy nukleinowe, w tym mikroRNA) do komórek docelowych poprzez proces internalizacji lub interakcję białek powierzchniowych EVs z receptorami na komórkach. Wydzielanie EVs odgrywa istotną rolę w utrzymaniu prawidłowych procesów fizjologicznych dzięki aktywnej wymianie sygnałów między komórkami (Jeppesen et al. 2023). Charakter i ilość transportowanych bio-ładunków zależy od rodzaju komórki, jej stanu (fizjologicznego lub patologicznego) oraz czynników wpływających na produkcję i wydzielanie EVs. Ostatecznym, a prawdopodobnie najczęstszym losem EVs w komórce docelowej jest ich kierowanie do lizosomów, co prowadzi do degradacji przenoszonych białek i lipidów. Ta ścieżka degradacyjna dostarcza istotne źródła metabolitów dla komórek docelowych (Niel et al. 2018). W badaniach nad EVs pochodzącymi z komórek nowotworowych odkryto, że egzosomy pochodzące z fibroblastów związanych z nowotworem

transportują metabolity, w tym aminokwasy, lipidy oraz pośrednie produkty cyklu Krebsa, i hamują mitochondrialną fosforylację oksydacyjną, znacząco zwiększając glikolizę (Zhao et al. 2016).

EVs wyizolowane z płynu pęcherzykowego (FF-EVs – follicular fluid EVs, tłumaczone na język polski jako follikulosomy) po raz pierwszy opisano u kłaczy w 2012 roku (Da Silveira et al. 2012), a następnie u krów (Sohel et al. 2013) i świń (Matsuno et al. 2017). W wymienionych badaniach wykryto i opisano materiał genetyczny zawarty w EVs w postaci miRNA. Zarówno w badaniach na materiale ludzkim, jak i na modelach bydlęcych wykryto elementy bio-ładunku w FF-EVs, które modulują procesy komórkowe. Najważniejsze z nich to regulacja: przetwarzania białek w retikulum endoplazmatycznym, cyklu komórkowego, mejozy oocytów, szlaków sygnalizacyjnych estrogenu, prolaktyny, dojrzewania oocytów, apoptozy oraz biosyntezy koneksyn i kwasów tłuszczowych (Martinez et al. 2018, Avila & Silveira, 2019). Odkryto również, że follikulosomy mogą zostać pobrane przez komórki pęcherzykowe *in vitro*, a następnie przeniknąć do cytoplazmy oocytu, gdzie – zarówno w komórkach pęcherzykowych, jak i w samych oocytach – mogą modulować różne szlaki komórkowe, w tym szlaki metabolizmu energetycznego (Rodrigues et al. 2019).

Opisano również wpływ FF-EVs na kompleksy oocyt-cumulus bydła dojrzewające w niekorzystnych warunkach, takich jak szok cieplny lub stres oksydacyjny. Co ciekawe, komórki narażone na stres oksydacyjny lub cieplny wytwarzały EVs zawierające czynniki ochronne, specyficzne dla danego czynnika stresogennego. Komórki, które otrzymały te EVs, wykazywały wyższą odporność na dany stres, co było widoczne m.in. w postaci niższego poziomu apoptozy i mniejszych uszkodzeń DNA w komórkach biorczych (Eldh et al. 2010; Bewicke-Copley et al. 2017). Natomiast dotychczas brak było danych na temat wpływu follikulosomów na kompleksy oocyt-cumulus w środowisku zaburzonego metabolizmu energetycznego.

1.3. Podstawowe szlaki metabolizmu energetycznego

Metabolizm energetyczny stanowi fundament funkcjonowania organizmów żywych. Obejmuje on zbiór złożonych procesów biochemicznych, odpowiedzialnych za pozyskiwanie, transfer, magazynowanie oraz wykorzystanie energii niezbędnej do wzrostu, rozmnażania, utrzymania integralności strukturalnej komórek oraz reagowania na zmienne warunki środowiskowe (Liu et al. 2025). Jego głównym celem jest produkcja adenosynotrójfosforanu (ATP), który pełni kluczową rolę w gospodarce energetycznej komórki. ATP jest często określany mianem

wysokoenergetycznego związku chemicznego z uwagi na obecność wiązań bezwodnikowych, które podczas hydrolizy uwalniają znaczną ilość energii swobodnej (Berg et al. 2018).

Pojęcie metabolizmu energetycznego zostało po raz pierwszy sformułowane przez Hermanna von Helmholtza w 1847 roku. Od tego czasu, dzięki intensywnym badaniom, wiedza na temat mechanizmów leżących u podstaw procesów energetycznych w komórkach znacząco się poszerzyła. Zidentyfikowano szereg współzależnych szlaków metabolicznych, takich jak glikoliza, cykl Krebsa oraz fosforylacja oksydacyjna, które wspólnie odpowiadają za efektywną konwersję składników odżywczych w ATP. Procesy te są ściśle regulowane przez enzymy oraz metabolity pośrednie, a ich prawidłowe funkcjonowanie warunkuje homeostazę komórkową i prawidłową aktywność narządową (Liu et al. 2025).

W kontekście źródeł energii dla organizmu szczególne znaczenie przypisuje się metabolizmowi glukozy oraz kwasów tłuszczowych (Wolfe, 1998). Metabolizm glukozy jest podstawowym mechanizmem produkcji energii, pokrywającym około 50–70% całkowitego zapotrzebowania energetycznego organizmu. Szlak glikolityczny jako pierwszy został szczegółowo opisany, a jego badania stanowią fundament naszej obecnej wiedzy na temat procesów wytwarzania energii na poziomie komórkowym (Chandel, 2021). Równolegle do postępów w badaniach nad metabolizmem glukozy coraz lepiej poznawane są również mechanizmy metabolizmu kwasów tłuszczowych, które odpowiadają za kolejne 30–50% zapotrzebowania energetycznego. Utlenianie kwasów tłuszczowych (FAO) jest jednym z kluczowych szlaków pozyskiwania energii przez komórki, szczególnie w okresie przedłużającego się postu, głodzenia lub umiarkowanego wysiłku fizycznego (Liu et al. 2025).

Zmiany w metabolizmie energetycznym są charakterystyczne dla wielu stanów chorobowych i często wiążą się ze zwiększonym zapotrzebowaniem na energię oraz przestawieniem komórek na alternatywne szlaki jej produkcji. Tego rodzaju adaptacje mogą prowadzić do dysfunkcji mitochondriów, która leży u podłoża wielu zaburzeń metabolicznych i przyczynia się do upośledzenia funkcji komórek lub ich śmierci.

1.3.1. Glukoza jako źródło energii

Metabolizm glukozy jest kluczowy dla utrzymania produkcji energii i prawidłowego funkcjonowania komórek. Większość węglowodanów dostarczanych z dietą ulega w układzie

pokarmowym hydrolizie, w wyniku której powstaje glukoza. Następnie trafia ona do krwiobiegu, skąd jest transportowana do tkanek, w których wykorzystywana jest głównie jako substrat energetyczny (Rodwell et al. 2015).

Glikoliza stanowi podstawowy szlak metaboliczny glukozy w komórkach, polegający na rozkładzie jednej cząsteczki glukozy na dwie cząsteczki pirogronianu. Proces ten zachodzi w cytozolu i obejmuje 10 reakcji enzymatycznych, prowadząc do powstania dwóch cząsteczek ATP bez konieczności udziału tlenu cząsteczkowego. W warunkach tlenowych pirogronian ulega dalszemu utlenieniu w mitochondriach, gdzie przekształcany jest do acetylo-CoA, który następnie zasila cykl Krebsa, umożliwiając dalszą produkcję ATP. Natomiast przy braku tlenu pirogronian jest redukowany do mleczanu (Berg et al. 2018).

Glikoliza pełni trzy istotne funkcje metaboliczne. Po pierwsze, jest kluczowym źródłem ATP w warunkach niedoboru tlenu lub w komórkach pozbawionych mitochondriów, takich jak erytrocyty. Po drugie, w obecności tlenu umożliwia dostarczenie pirogronianu do mitochondriów, wspierając wydajną produkcję energii. Po trzecie, produkty pośrednie glikolizy i cyklu Krebsa uczestniczą w licznych szlakach anabolicznych, takich jak szlak pentozofosforanowy, heksozoaminowy, poliolowy oraz biosynteza seryny i glicerolu. Szlaki te dostarczają NADPH oraz prekursorów niezbędnych do syntezy glikogenu, lipidów, białek i nukleotydów (Chandel, 2021).

Wymieniony powyżej szlak pentozofosforanowy (PPP) jest alternatywną drogą metabolizmu glukozy. Nie prowadzi do powstawania ATP, ale pełni dwie główne funkcje: (1) wytwarzanie NADPH, które jest wykorzystywane do syntezy kwasów tłuszczowych i steroidów oraz do utrzymania zredukowanego glutationu niezbędnego do aktywności antyoksydacyjnej, oraz (2) syntezę rybozy, potrzebnej do tworzenia nukleotydów i kwasów nukleinowych (Rodwell et al. 2018).

Wzajemne oddziaływania szlaków glikolitycznego i pentozofosforanowego umożliwiają dostosowanie stężenia NADPH, ATP i związków budulcowych, takich jak rybozo-5-fosforan i pirogronian, do stale zmieniających się potrzeb komórki (Berg et al. 2018).

1.3.2. Lipidy jako źródło energii

Lipidy to duża grupa związków organicznych o bardzo zróżnicowanej budowie. Klasyfikuje się je na lipidy proste (estry kwasów tłuszczowych z alkoholami, np. triacyloglicerole) oraz

lipidy złożone. Lipidy złożone zawierają dodatkowe grupy funkcyjne i obejmują między innymi fosfolipidy (zawierające resztę kwasu fosforowego) oraz glikolipidy (zbudowane z kwasu tłuszczowego, sfingozyny i komponenty węglowodanowej). Do lipidów zalicza się również lipoproteiny – złożone kompleksy lipidowo-białkowe, które pełnią funkcję nośników lipidów w osoczu oraz uczestniczą w ich dystrybucji i metabolizmie w organizmie (Rodwell et al. 2018). Ze względu na znaczną różnorodność chemiczną, lipidy dzieli się na klasy i podklasy, które można zdefiniować jako grupy lipidów o wspólnej strukturze chemicznej oraz unikalnej funkcji biologicznej. W obrębie podklas wyróżnia się gatunki lipidów (ang. lipid species), czyli konkretne formy cząsteczek lipidowych, różniące się budową chemiczną – m.in. długością i rodzajem łańcuchów kwasów tłuszczowych oraz stopniem ich nasycenia (Kimura et al. 2016).

Większość lipidów zawiera kwasy tłuszczowe (FA) jako element swojej struktury (Carvalho & Caramujo, 2018). Kwasy tłuszczowe spełniają liczne funkcje: pełnią rolę strukturalną jako składniki fosfolipidów budujących błony komórkowe, stanowią magazyn energii w postaci lipidów obojętnych, a ich pochodne biorą udział w sygnalizacji komórkowej (Dyall et al. 2022). Gdy potrzebna jest dodatkowa ilość ATP, kwasy tłuszczowe odgrywają istotną rolę jako substraty energetyczne. W przeliczeniu na suchą masę, kwasy tłuszczowe dostarczają dwukrotnie więcej ATP niż węglowodany (Carracedo et al. 2013).

Utlenianie kwasów tłuszczowych, czyli β -oksydacja, poprzedzone jest ich aktywacją w cytoplazmie, gdzie przekształcane są do acylo-CoA (Chandel, 2021). Następnie acylo-CoA łączy się z karnityną, tworząc cząsteczkę acylokarnityny, która jest transportowana za pomocą transferazy palmitoilokarnitynowej 1 przez zewnętrzną błonę mitochondrialną. Po wejściu do macierzy mitochondrialnej cząsteczka acylokarnityny ponownie przekształcana jest w acylo-CoA, który następnie ulega całkowitemu rozkładowi w cyklu reakcji (Rinaldo et al. 2002). W każdej rundzie tego cyklu odłączane są po dwa atomy węgla od końca karboksylowego cząsteczki, co prowadzi do powstania jednej cząsteczki acetylo-CoA. Powstały acetylo-CoA metabolizowany jest w cyklu Krebsa, gdzie ulega utlenieniu do dwóch cząsteczek CO_2 , a w wyniku kolejnych reakcji powstają zredukowane formy nukleotydów - trzy cząsteczki NADH oraz jedna cząsteczka FADH_2 – podobnie jak w przypadku acetylo-CoA powstałego z pirogronianu (Carvalho & Caramujo, 2018). Chociaż kwasy tłuszczowe mogą być pobierane przez komórki ze środowiska, alternatywnie mogą pochodzić z syntezy *de novo*. Synteza kwasów tłuszczowych zachodzi w cytoplazmie przy udziale syntazy kwasów tłuszczowych, która wymaga obecności acetylo-CoA i NADPH (Kaneko, 2016).

Kwasy tłuszczowe mogą być również estryfikowane z glicerolem lub szkieletem sterolowym, prowadząc do powstania odpowiednio trójglicerydów (triacylgliceroli) i estrów steroli. Powstałe trójglicerydy oraz estry steroli otaczane są jednowarstwą fosfolipidową oraz specyficznymi białkami, tworząc w ten sposób krople lipidowe (LD) (Farese & Walther, 2009).

Krople lipidowe (Fig. 2) są dynamicznymi organellami odgrywającymi kluczową rolę w metabolizmie komórki. W warunkach zapotrzebowania energetycznego, krople lipidowe ulegają degradacji poprzez lipolizę i/lub lipofagię, a uwolnione wolne kwasy tłuszczowe są transportowane do mitochondriów, gdzie w procesie β -oksydacji przekształcane są w ATP (Zechner et al. 2017). Podczas tego procesu, krople lipidowe zbliżają się do mitochondriów, co prawdopodobnie ułatwia efektywny transport kwasów tłuszczowych do wnętrza tych organelli, jednocześnie zapobiegając ich nadmiernemu uwalnianiu w komórce, co mogłoby prowadzić do lipotoksyczności i zakłóceń w sygnalizacji lipidowej (Ibayashi et al. 2021).

Interakcje między kroplami lipidowymi a innymi organellami wewnątrzkomórkowymi, takimi jak retikulum endoplazmatyczne (ER), są niezbędne do transportu zmagazynowanych lipidów. Połączenia ER-LD zapewniają odpowiedni skład lipidowy i białkowy kropli lipidowych, a ich interakcje z innymi strukturami komórkowymi umożliwiają skuteczne wykorzystanie zmagazynowanych zasobów energetycznych (Barbosa & Siniossoglou, 2017). Sugeruje się, że rozmieszczenie kropli lipidowych może odzwierciedlać stan metaboliczny oocyta lub zarodka – rozproszenie LD wiąże się z efektywniejszym przebiegiem β -oksydacji, podczas gdy ich fuzja koreluje z intensyfikacją glikolizy (Bradley & Swann, 2019).

Ponadto, krople lipidowe biorą udział w kontroli jakości białek, izolując nieprawidłowo sfałdowane białka oraz toksyczne lipidy, co zmniejsza stres w retikulum endoplazmatycznym. LD pełnią również rolę platform sygnalizacyjnych podczas infekcji, reagując z patogenami i modulując odpowiedź immunologiczną. Zaburzenia funkcji LD w warunkach stresu komórkowego są powiązane z wieloma chorobami, co podkreśla ich kluczową rolę w adaptacji komórkowej oraz obronie przed szkodliwymi czynnikami (Henne et al. 2018).

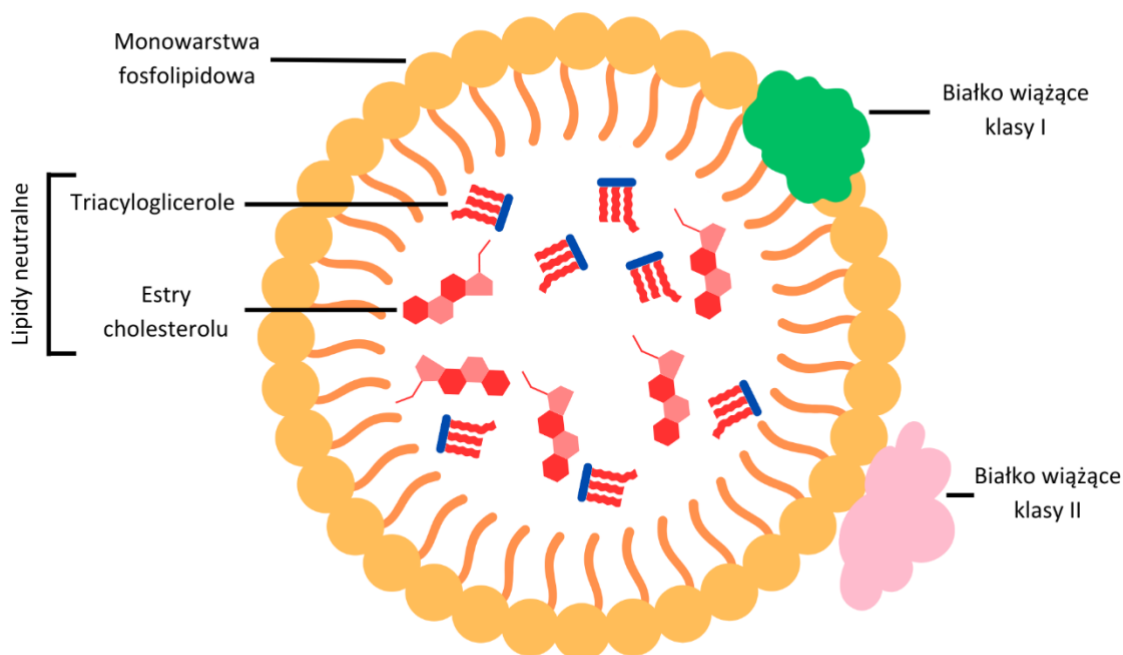


Fig. 2. Schemat budowy kropli lipidowej (grafika własna).

1.4. Metabolizm energetyczny w obrębie pęcherzyka jajnikowego

Prawidłowo działający metabolizm energetyczny kompleksu oocyt-cumulus stanowi kluczowy czynnik w dojrzewaniu oocyta oraz jego zdolności do dalszego rozwoju w zdrowy zarodek.

Głukoza jest głównym metabolitem energetycznym dla kompleksów oocyt-cumulus. Większość glukozy wykorzystywanej przez COC jest metabolizowana w komórkach pęcherzykowych. Oocyt jest niemal całkowicie zależny od komórek pęcherzykowych w zakresie pobierania glukozy i jej metabolitów (Fig. 3). Ograniczona zdolność oocyta do pobierania glukozy wynika z braku ekspresji transportera glukozy o wysokim powinowactwie regulowanego insuliną, *SLC2A4* (lub *GLUT4*) (Sutton-McDowall et al. 2010). Ponadto, zdolność oocyta do metabolizowania glukozy poprzez glikolizę jest ograniczona z powodu niskiej aktywności kluczowego enzymu glikolitycznego - fosfofruktokinazy (Cetica et al. 2002). Komórki pęcherzykowe metabolizują glukozę poprzez cztery główne szlaki: glikolizę, szlak pentozofosforanowy, szlak heksozaminowy oraz poliolowy. Dzięki wysokiej aktywności fosfofruktokinazy, komórki pęcherzykowe przekształcają glukozę w pirogronian, mleczan oraz

NADPH, które następnie są przekazywane do oocyty za pośrednictwem transportu ułatwionego i dyfuzji przez TZPs. Pirogronian i mleczan (po uprzednim utlenieniu do pirogronianu) są dalej metabolizowane w oocycie poprzez cykl Krebsa, po czym w procesie fosforylacji oksydacyjnej dostarczają ATP niezbędne do prawidłowego rozwoju oocyty (Sutton-McDowall et al. 2010).

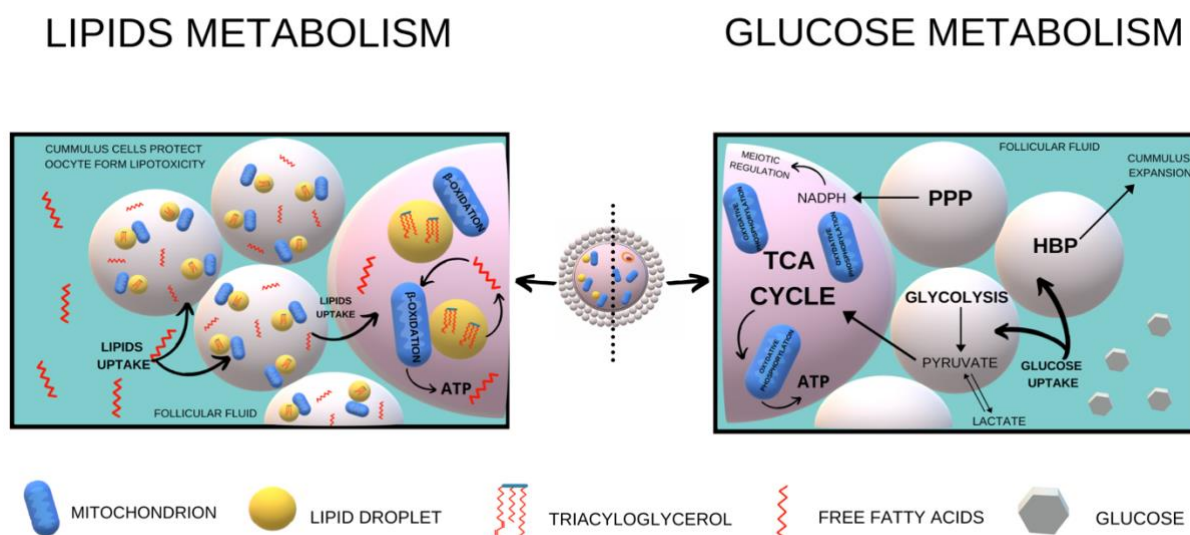


Fig. 3. Diagram przedstawiający mechanizmy metabolizmu lipidów i glukozy w kompleksie oocyt-cumulus. Lewa część diagramu przedstawia metabolizm lipidów, natomiast prawa część koncentruje się na metabolizmie glukozy. W obu szlakach kluczową rolę odgrywają komórki pęcherzykowe, które pobierają lipidy i glukozę z płynu pęcherzykowego, chronią oocyt przed lipotoksycznością (metabolizm lipidów) lub przekształcają glukozę w pirogronian (metabolizm glukozy). Końcowym produktem metabolizmu zarówno lipidów, jak i glukozy jest ATP (źródło: Warzych & Lipińska, 2020).

Wraz z postępem dojrzewania kompleksów oocyt-cumulus u bydła obserwuje się wzrost zużycia glukozy, pirogronianu i tlenu, co wskazuje na rosnące zapotrzebowanie na energię. Średnie stężenie glukozy w płynie pęcherzykowym jest porównywalne z jej poziomem w osoczu. W zależności od gatunku, dla bydła mieści się w zakresie od 1,4 do 5 mM (Sutton-McDowall et al. 2005). Chociaż w warunkach *in vivo* poziom glukozy może podlegać dynamicznym wahaniom w zależności od stanu fizjologicznego samicy, dojrzewanie *in vitro* ma miejsce w stabilnym środowisku o ściśle określonym składzie. Badania wykazały, że optymalne stężenie glukozy w medium do dojrzewania dla oocytów bydła wynosi od 2,3 do 10

mM, a każde wyższe lub niższe stężenie może być szkodliwe dla ich rozwoju (Sutton-McDowall et al. 2010).

Drugim źródłem energii dla dojrzewającego oocyty są lipidy (Fig. 3). Metabolizm lipidów odgrywa kluczową rolę w utrzymaniu homeostazy mikrośrodowiska pęcherzykowego. Obserwuje się obniżenie poziomu trójglicerydów, fosfolipidów, cholesterolu oraz całkowitej zawartości lipidów w oocytach podczas dojrzewania. Zmiany te sugerują istotną rolę metabolizmu lipidów w tym procesie. Warto jednak zaznaczyć, że stopień zależności od metabolizmu lipidów w oocytach różni się pomiędzy gatunkami (Shi & Sirard, 2022).

W trakcie folikulogenezy płyn pęcherzykowy zawiera określone stężenia kwasów tłuszczowych, które mogą być wychwytywane przez komórki wieńca promienistego w celu pozyskania energii oraz jej przekazania oocytowi (Sanchez-Lazo et al. 2014). Zawartość niezestryfikowanych kwasów tłuszczowych (wolnych kwasów tłuszczowych, NEFA) w płynie pęcherzykowym zależy od ich stężenia w surowicy. W warunkach fizjologicznych stężenie NEFA w surowicy bydła utrzymuje się na poziomie 100–300 μM , natomiast u świń wynosi pomiędzy 200–400 μM i 600–800 μM , a u człowieka 600–700 μM . Różnice międzygatunkowe w zawartości kwasów tłuszczowych znajdują odzwierciedlenie także w płynie pęcherzykowym. Stężenie NEFA waha się w zależności od gatunku i wynosi około 600–900 μM u świń, 100–300 μM u bydła oraz około 200 μM u ludzi (Shi & Sirard, 2022). Ponadto, oocyty różnych gatunków ssaków wykazują zróżnicowaną zawartość kropli lipidowych, co wpływa zarówno na ich wygląd mikroskopowy jak i metabolizm energetyczny. Niedojrzałe oocyty świń i krów charakteryzują się wysoką zawartością lipidów (odpowiednio 161 ng i 63 ng kwasów tłuszczowych), co sprawia, że pod mikroskopem optycznym wydają się ciemniejsze (McEvoy et al. 2000). Z kolei oocyty myszy zawierają znacznie mniej kropli lipidowych (4 ng kwasów tłuszczowych), a ich cytoplazma jest przezroczystsza (Dunning et al. 2014, Bradley & Swann, 2019).

Jak wcześniej wspomniano, stężenie wolnych kwasów tłuszczowych w płynie pęcherzykowym zależy od ich poziomu w surowicy, który z kolei ulega modyfikacjom poprzez dietę. W związku z tym kwasy tłuszczowe dostarczane wraz z pożywieniem, a dalej metabolizowane w organizmie, mogą zaburzać pierwotny profil lipidowy płynu pęcherzykowego. Zaburzenia metaboliczne występujące u samic, takie jak otyłość (u kobiet) czy ujemny bilans energetyczny (u krów), zostały w literaturze powiązane z podwyższonymi stężeniami NEFA w płynie pęcherzykowym (Valckx et al. 2014b, Leroy et al. 2005). Z kolei w warunkach *in vitro*

udokumentowano, że wysoka zawartość kwasów tłuszczowych w pożywce do dojrzewania oocytów była prowadząca do obniżenia zarówno odsetka zarodków podejmujących podziały, jak i końcowego odsetka blastocyst. W uzyskanych blastocystach zaobserwowano zmiany molekularne sugerujące zaburzenia w szlakach metabolicznych lipidów i węglowodanów (van Hoeck et al. 2011). Z tego względu utrzymanie odpowiedniego poziomu kwasów tłuszczowych w środowisku dojrzewania oocytu wydaje się kluczowe dla zapewnienia prawidłowego dojrzewania oocytów oraz ich potencjału rozwojowego.

Należy zauważyć, że chociaż glukoza i kwasy tłuszczowe stanowią główne źródła energii podczas rozwoju oocytu, równowaga między wytwarzaniem ATP z pirogronianu a jego produkcją w wyniku utleniania kwasów tłuszczowych pozostaje niejasna. Ponadto, nie jest dokładnie określone, jaka część ATP w rozwijającym się oocycie pochodzi z utleniania kwasów tłuszczowych, ani czy kwasy tłuszczowe są pozyskiwane z endogennych kropli lipidowych, czy też ze źródeł egzogennych (Khan et al. 2020).

1.5. Metabolizm energetyczny podczas rozwoju zarodkowego

Przedimplantacyjny rozwój zarodków ssaków to złożony, dobrze zorganizowany proces, który wiąże się z wieloma zmianami zarówno na poziomie molekularnym, jak i komórkowym. Kluczowymi procesami determinującymi jakość zarodka są m.in. prawidłowe zapłodnienie, czas pierwszego podziału, aktywacja genomu zarodka oraz epigenetyczne przeprogramowanie, które obejmuje metylację/demetylację i modyfikacje histonów (Deutsch et al. 2014; Sudano et al. 2016). Kolejne stadia rozwoju zarodka bydłęcego wraz ze średnimi czasami ich występowania przedstawiono na Figurze nr 4.

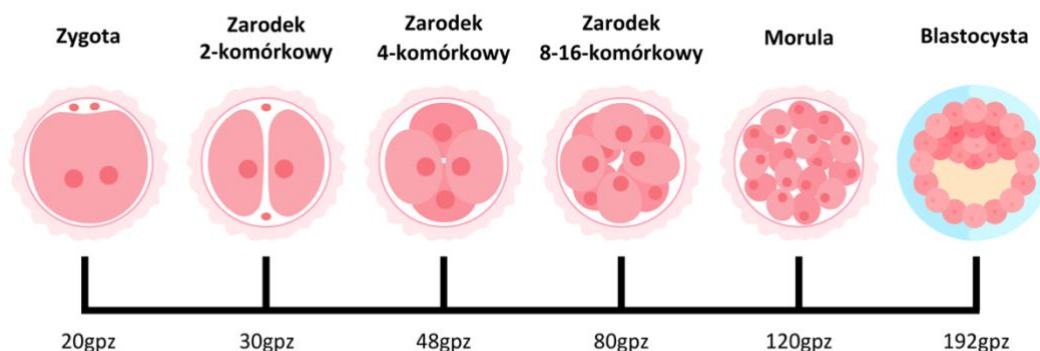


Fig. 4. Schemat rozwoju zarodka przedimplantacyjnego bydła, wraz ze wskazanymi średnimi czasami, w których dane stadium najczęściej występuje (gpz – godziny po zapłodnieniu) (grafika własna).

Metabolizm energetyczny we wczesnych podziałach zarodków bydła, aż do aktywacji genomu zarodkowego (EGA) na etapie 8/16 komórek, przebiega stosunkowo wolno i opiera się na matczynej mRNA, białkach oraz metabolitach zgromadzonych w cytoplazmie w trakcie wzrostu i dojrzewania oocyty (de Lima et al. 2018). Na wczesnych etapach rozwoju przedimplantacyjnego zarodek zużywa głównie pirogronian i mleczan. Bezpośrednio przed oraz po EGA obserwuje się zauważalny wzrost zapotrzebowania na energię, związany z dalszą proliferacją i różnicowaniem komórek, formowaniem blastocelu oraz wylęganiem blastocysty (Milazzotto et al. 2020; Milazzotto et al. 2022). Dodatkowo, znaczące zmiany metaboliczne po EGA wpływają na profil lipidowy, jego wykorzystanie i związane z nim szlaki metaboliczne.

Lipidom zarodków, czyli zestaw wszystkich chemicznie unikalnych gatunków lipidowych w nich występujących (Han & Gross, 2022), wykazuje dużą wrażliwość na czynniki środowiskowe. Uwidacznia się to m.in. w różnicach między rozwojem zarodków *in vivo* a hodowlą *in vitro*. W warunkach *in vitro* zaobserwowano zwiększoną akumulację trójglicerydów w kroplach lipidowych w blastocystach bydlęcych (Sudano et al. 2011), a także zmiany w całkowitej zawartości lipidów w odpowiedzi na stres (Janati Idrissi et al. 2021). Co ciekawe, w zarodkach bydlęcych rozwijających się w warunkach *in vivo* i *in vitro* obserwuje się różnice w regulacji tego samego szlaku metabolizmu lipidów - szlaku biosyntezy acylo-CoA, przy czym w stadium blastocysty profile ekspresji ulegają wyrównaniu (Milazzotto et al.

2022). Aktywność szlaków metabolicznych lipidów różni się również w zależności od gatunku. Przykładowo, analiza szlaku biosyntezy acylo-CoA u myszy i bydła w warunkach *in vitro* wykazuje odwrotne wzorce regulacji na kolejnych etapach rozwoju zarodka, aż do stadium blastocysty, gdzie aktywność tego szlaku jest już podobnie kontrolowana w obu gatunkach. W związku z tym cechy metabolizmu lipidów, takie jak poziom akumulacji i zużycia lipidów oraz charakterystyka profilu lipidowego, mogą być istotnymi wskaźnikami jakości zarodka i stanowić wartościowy marker jego żywotności (Ghanem et al. 2014; Milazzotto et al. 2022).

Innym czynnikiem, który może wpływać na metabolizm lipidów rozwijającego się zarodka, jest pochodzenie genomu. Klasyczne zapłodnienie opiera się na połączeniu genomu matczynego (oocyt) i ojcowskiego (plemnik). Oocyty ssaków mogą również zostać aktywowane partenogenetycznie (PA), bez udziału gamety męskiej, co prowadzi do powstania diploidalnej zygoty zawierającej wyłącznie DNA matczyne. Podkreślić jednak należy, że zarodki te zatrzymują się w rozwoju w stadium blastocysty, a ich pozyskiwanie wykorzystywane jest wyłącznie dla celów naukowych (Singh et al. 2019). Brak genomu ojcowskiego wpływa na rozwój zarodka, m.in. poprzez zmienioną aktywność genów imprintingowych związanych z proliferacją, różnicowaniem i apoptozą (Bischoff et al. 2009). Wykazano również różnice w czasie największej aktywności transkrypcyjnej – w zarodkach partenogenetycznych przypada ona na stadium moruli, a w zarodkach pochodzących z zapłodnienia *in vitro* na stadium blastocysty, przy czym zarodki PA cechują się wyższym poziomem apoptozy (Li et al. 2021).

2. Hipoteza i cele pracy

Zrozumienie mechanizmów regulacji gospodarki lipidowej oraz roli follikulosomów w środowisku pęcherzykowym bydła może przyczynić się do opracowania bardziej efektywnych metod wspomagania rozrodu w hodowli zwierząt oraz udoskonalenia technik dojrzewania *in vitro* i hodowli zarodków. W kontekście powyższej tematyki sformułowano hipotezę badawczą oraz określono cele pracy.

Hipoteza:

Kluczowym elementem mającym wpływ na metabolizm energetyczny zarówno oocytów, jak i powstałych po zapłodnieniu zarodków, jest środowisko pęcherzykowe, ze szczególną rolą follikulosomów. Ponadto, metabolizm lipidowy ulega zmianie na przestrzeni rozwoju przeimplantacyjnego zarodka, co wiąże się ze zmianą w zapotrzebowaniu na różne źródła energii.

Cele badań:

1. Kompleksowa analiza follikulosomów bydłych jako elementu systemu komunikacji międzykomórkowej w środowisku pęcherzykowym oraz określenie wpływu suplementacji follikulosomami na oocyty i uzyskiwane po zapłodnieniu i hodowli *in vitro* blastocysty.
2. Zbadanie wpływu suplementacji follikulosomami na kompleksy oocyt-cumulus podczas dojrzewania *in vitro* w niekorzystnym środowisku z inhibitorami metabolizmu energetycznego.
3. Charakterystyka parametrów lipidowych podczas rozwoju zarodków bydłych w stadiach przedimplantacyjnych.
4. Określenie wpływu gamety męskiej na ilościowe i jakościowe parametry kropli lipidowych zarodków bydłych (zapłodnienia *in vitro* vs. partenogeneza).
5. Charakterystyka różnic międzygatunkowych (świnia vs bydło) parametrów kropli lipidowych podczas rozwoju zarodków w stadiach przedimplantacyjnych.

3. Materiały i metody

Cele pracy przedstawione w rozdziale 2 na stronie 28 zostały zrealizowane w dwóch eksperymentach, szczegółowo opisanych w dalszej części tego rozdziału.

3.1. Materiał badawczy

Materiał badawczy obu eksperymentów stanowiły pozyskane poubojowo jajniki bydlęce, z których aspirowane były kompleksy oocyt-cumulus oraz płyn pęcherzykowy (szczegółowy opis w podrozdziale *Metody badawcze*). Badania zostały przeprowadzone zgodnie z polską ustawą o ochronie zwierząt wykorzystywanych do celów edukacyjnych lub naukowych z dnia 15 stycznia 2015 r. oraz dyrektywą 2010/63/UE Parlamentu Europejskiego z dnia 22 września 2010 r. (Dz.U. 2015 poz. 266) dotyczącą ochrony zwierząt wykorzystywanych do celów naukowych. W związku z tym badania nie wymagały zgody właściwej komisji etycznej ds. doświadczeń na zwierzętach.

3.2. Metody badawcze

3.2.1. Eksperyment nr 1

Eksperyment nr 1 (układ doświadczalny - Fig. 5) dotyczył celów 1-2 niniejszej dysertacji, a uzyskane wyniki zostały przedstawione w publikacji pt. „Follicular fluid extracellular vesicles support energy metabolism of bovine oocytes, improving blastocyst development and quality” opublikowanej w czasopiśmie *Biology of Reproduction*.

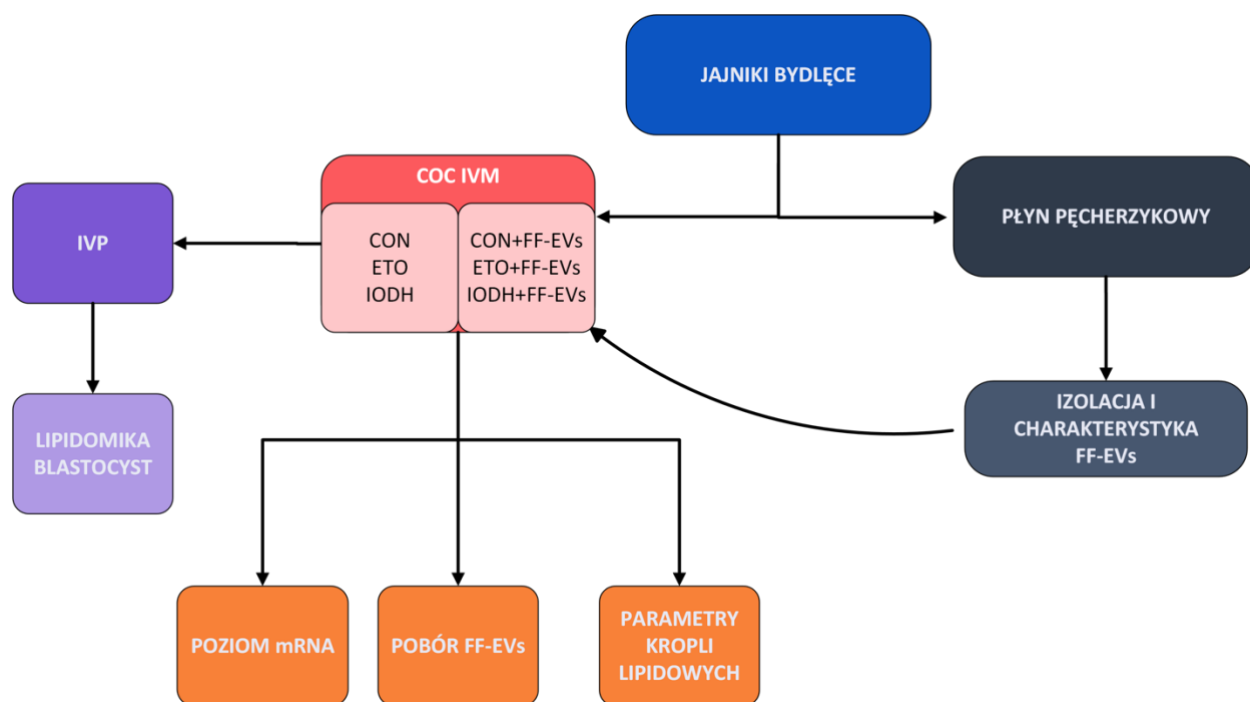


Fig.5. Układ doświadczalny eksperymentu nr 1 (grafika własna).

Pozyskiwanie płynu pęcherzykowego oraz izolacja follikulosomów (FF-EVs)

Płyn pęcherzykowy pobierano z pęcherzyków jajnikowych (o średnicy 4-8 mm) krów rasy Belgian Blue i Holstein w sześciu powtórzeniach. Jajniki były wybierane na podstawie następujących kryteriów: 1) brak ciałek żółtych, 2) brak pęcherzyków o średnicy większej niż 25 mm oraz 3) prawidłowe cechy morfologiczne, takie jak brak zrostów i blizn. Płyn pęcherzykowy aspirowano z pęcherzyków za pomocą jałowej strzykawki i igły o średnicy 1,2 mm w ciągu około dwóch godzin po pobraniu jajników. Uzyskane próby zostały następnie odwirowane w 4°C, 2000g. Supernatant przefiltrowano przez filtr 0,22 µm, aby usunąć zanieczyszczenia komórkowe z płynu, a następnie przeniesiono do probówek kriogenicznych i przechowywano w temperaturze -80°C.

Izolację pęcherzyków zewnątrzkomórkowych z płynu pęcherzykowego przeprowadzono zgodnie z procedurą opisaną przez Asaadi et al. (2021). Roztwór roboczy jodiksanolu przygotowano poprzez dodanie buforu (60 mM Tris-HCl, 6 mM EDTA i 0,25 M sacharozy (pH 7,4)) do roztworu OptiPrep™ Medium Gradientu Gęstości (Sigma-Aldrich). Następnie bufor homogenizacyjny (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA i 0,25 M sacharozy (pH 7,4)) połączono z roztworem roboczym jodiksanolu, tworząc gradienty o stężeniu 5%, 10%, 20% i 40%. Na

przygotowane gradienty nałożono po 1 ml próbek płynu pęcherzykowego. Następnie próby odwirowano w 4 °C przez 18 godzin przy 100000g (Beckman Coulter, Brea, CA, USA). Frakcje gradientu o objętości 1 ml zbierano, zaczynając od góry gradientu. Frakcje 9 i 10, odpowiadające gęstości 1,087–1,109 g/mL, połączono, rozcieńczono w PBS i odwirowano przez 3 godziny przy 100000g i 4 °C. Uzyskany osad EVs z płynu pęcherzykowego z każdej próbki połączono i uzyskano ostateczne stężenie 98,7 mg/ml, które zmierzono za pomocą NanoDrop. Izolat przechowywano w temperaturze -80°C do dalszego wykorzystania.

Charakterystyka FF-EVs

Aby ocenić rozmiar i wyjściowe stężenie FF-EVs wyizolowanych z płynu pęcherzykowego, przeprowadzono analizę NTA (ang. nanoparticle tracking analysis) za pomocą mikroskopu NanoSight LM10. Sześć partii wyizolowanych EVs zmieszano i rozcieńczono w PBS, aby osiągnąć stężenie cząstek na poziomie około 10^8 – 10^9 cząstek/mL. Dla każdej próbki zarejestrowano trzy indywidualne nagrania, które następnie przeanalizowano za pomocą NTA (NTA 3.4 – Sample Assistant Build 3.4.4 – SA).

Następnie, FF-EVs zostały poddane identyfikacji morfologicznej za pomocą mikroskopii transmisyjno-elektronowej (TEM). Każda próbka została umieszczona na siatkach do mikroskopii elektronowej, pokrytych wcześniej folią podporową formwar/węgiel (FCF200H-CU-TB; Aurion). Do analizy przygotowanych siatek wykorzystano mikroskopy elektronowe (JEM 1400 plus, JEOL, Benelux oraz Zeiss EM 109, Carl Zeiss). Obrazy zostały zarejestrowane przy użyciu kamery CCD Quemas (Olympus Soft Imaging Solutions GMBH).

W celu potwierdzenia obecności FF-EVs w próbkach przeprowadzono analizę Western blot (WB) z wykorzystaniem markerów specyficznych dla pęcherzyków zewnątrzkomórkowych: CD63, CD9 i TSG101. Próby rozpuszczono w buforze redukującym [0,005% błękitu bromofenolowego, 3% 2-merkaptetanolu, 9,2% SDS, 40% glicerolu oraz 0,5 M Tris-HCl (pH 6,8)] i ogrzewano przez 5 minut w temperaturze 95°C. Do rozdzielania białek zastosowano elektroforezę w żelu poliakrylamidowym z SDS. Próbki przeniesiono na membrany nitrocelulozowe, które następnie blokowano przez 45 minut w temperaturze pokojowej. Membrany inkubowano przez noc w temperaturze 4°C z przeciwciałami pierwszorzędowymi: CD63 króliczym (1:200 w 5% BSA + 0,5% Tween PBS, ab68418, Abcam), CD9 króliczym (1:1 000 w 5% BSA + 0,5% Tween PBS, CST-D3H4P, Cell Signaling Technology) oraz TSG101 mysim (1:1 000 w 5% BSA + 0,5% Tween PBS, sc-7964). Po inkubacji membrany

przemyto, a następnie poddano inkubacji ze specyficznymi przeciwciałami drugorzędowymi (przeciw mysim IgG [GE Healthcare UK], 1:3 000 w 5% mleka + 0,5% Tween PBS; przeciw króliczym IgG [GE Healthcare UK], 1:4 000 w 5% BSA + 0,5% Tween PBS). Po końcowym etapie płukania na membrany naniesiono substrat chemiluminescencyjny (WesternBright Sirius, Advansta). Obrazowanie przeprowadzono za pomocą systemu Proxima 2850 Imager (IsoGen Life Sciences).

Pobieranie kompleksów oocyt-cumulus

Kompleksy oocyt-cumulus zostały pozyskane z pęcherzyków jajnikowych o średnicy około 3–5 mm. Do eksperymentu wybrano COC bez oznak degradacji cytoplazmy, ściśle przylegające do osłonki przejrzystej i otoczone co najmniej 3–4 warstwami komórek ziarnistych.

Dojrzewanie in vitro

Dojrzewanie *in vitro* przeprowadzono przez 22h w 500 μ L pożywki w warunkach 39°C, 5% CO₂ i maksymalnej wilgotności. Kompleksy oocyt-cumulus dojrzewały w pożywce TCM199+Glutamax (Gibco, Thermo Fisher Scientific, MA, Stany Zjednoczone) wzbogaconej o 6 mg/mL fafBSA (albumina surowicy bydlęcej wolna od kwasów tłuszczowych), 0,25 mM pirogronianu sodu, 1x stężony roztwór penicyliny-streptomycyny, 2 μ g/mL FSH oraz 1 μ g/mL β -estradiolu.

W doświadczeniu zastosowano grupę kontrolną oraz dwie grupy traktowane inhibitorami metabolizmu glukozy lub kwasów tłuszczowych. Wszystkie trzy grupy (kontrolna i dwie z inhibitorami) były suplementowane lub nie suplementowane FF-EVs, co dało łącznie 6 grup:

1. CON – grupa kontrolna bez suplementacji, gdzie dojrzewanie *in vitro* odbywało się w podstawowej pożywce;
2. IODH, gdzie pożywka IVM była suplementowana dwoma inhibitorami metabolizmu glukozy [1,5 μ M kwas jodooctowy (IO, inhibitor glikolizy) rozpuszczony w wodzie i 150 μ M dehydroepiandrosteron (DHEA, inhibitor szlaku pentozofosforanowego) rozpuszczony w DMSO (dimetylosulfotlenek)];
3. ETO, gdzie pożywka IVM była suplementowana inhibitorem metabolizmu kwasów tłuszczowych [150 μ M etomoksir rozpuszczony w DMSO (dimetylosulfotlenek)];

4. CON+, gdzie dojrzewanie było przeprowadzane w podstawowej pożywce suplementowanej 6,5 µg/mL FF-EVs;
5. IODH+, gdzie pożywka IVM była suplementowana IO i DHEA oraz 6,5 µg/mL FF-EVs;
6. ETO+, gdzie pożywka IVM była suplementowana etomoksirem oraz 6,5 µg/mL FF-EVs.

FF- EVs zostały dodane w objętości 10 µl do każdego dołka z pożywką do dojrzewania *in vitro*. Ich stężenie obliczono zgodnie z wcześniej opublikowanymi wytycznymi wg Carney et al. (2024). Po dojrzewaniu COC zostały albo pozbawione warstwy komórek ziarnistych i utrwalone do dalszych procedur, albo poddane ko-inkubacji z plemnikami (zapłodnienie *in vitro*).

Zapłodnienie in vitro (IVF)

Nasienie pozyskane od dwóch buhajów zostało zakupione w komercyjnej stacji unasienniania. Ruchliwą frakcję plemników wyselekcjonowano za pomocą systemu BoviPure™ zgodnie z protokołem producenta (Nidacon, Mölndal, Szwecja). Nasienie zostało rozmrożone i odwirowane w dwóch warstwach roztworu BoviPure™ (80% i 40%), a następnie osad przepłukano w roztworze BoviWash™. Końcowe stężenie plemników określono pod mikroskopem (Nikon YS2-T) w komorze Bürkera (BRANDT). Inkubację gamet przeprowadzono przy stężeniu plemników wynoszącym $1 \times 10^6/\text{ml}$ przez 20 godzin w 500 µl kroplach. Pożywka do IVF została wzbogacona o PHE (penicylinę, hipotaurynę, epinefrynę) (Parrish et al., 1986).

Hodowla zarodków

Po zakończeniu procedury zapłodnienia pozaustrojowego, zarodki zostały przeniesione w grupach po 25-30 do 70 µl kropli pożywki SOF+fafBSA, przykrytych olejem mineralnym. Inkubowano je w atmosferze o składzie gazowym 5% CO₂, 5% O₂ i 90% N₂, w temperaturze 39°C (Warzych et al. 2020). W 5. dniu hodowli połowa objętości kropli została wymieniona na świeżą pożywkę. W tym czasie określano również procent zarodków, jakie podjęły podziały mitotyczne.

Barwienia kropli lipidowych

COC przeznaczone do analizy kropli lipidowych były dojrzewane w indywidualnych kroplach po 20 μL pod olejem (jeden COC w jednej kropli pożywki). Po dojrzewaniu zostały one przepłukane, a następnie komórki pęcherzykowe oddzielono od oocytów poprzez pipetowanie. Pojedyncze oocyty (w płytkach Nunc) oraz komórki pęcherzykowe (połączone z 17 COC w jednej probówce Eppendorf 1,5 ml) zostały utrwalone w 500 μL 4% paraformaldehydu (PFA) i przechowywane w temperaturze 4°C do dalszej analizy.

Utrwalone oocyty były permeabilizowane roztworem 0,2% Triton X-100 przez 20 minut w temperaturze pokojowej. Do wybarwienia kropli lipidowych użyto barwnika BODIPY 493/503 w stężeniu 20 $\mu\text{g/mL}$ (Thermo Fisher Scientific, MA, USA) i inkubowano komórki w temperaturze pokojowej przez 1 godzinę, w ciemności. Chromatyna została zwizualizowana przez barwienie roztworem 0,5 $\mu\text{g/mL}$ Vectashield DAPI (4',6-diamidino-2-fenylindol; DAPI; Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA).

Komórki pęcherzykowe oddzielone od COC, zostały odwirowane przy 1000g przez 5 minut, ponownie zawieszone w świeżym PBS i rozmieszczone na szklanych szkiełkach (SuperFrost Menzel, ThermoFisher Scientific) za pomocą wirówki Cytospin 4 (ThermoFisher Scientific). Następnie zastosowano ten sam protokół barwienia, co dla oocytów.

Analiza mikroskopowa

Wybarwione oocyty i komórki pęcherzykowe były analizowane za pomocą mikroskopu konfokalnego Zeiss LSM 880, wykorzystującego filtr 488 nm z pasmem przepustowym 500–550 nm do barwnika BODIPY 493/503 (laser Argon2), 420–480 nm do barwnika DAPI (laser Diode 405) z obiektywem LD LCI Plan Apochromat 40x/1.2 Imm Korr DIC 27 (Zeiss, Niemcy). Każda analizowana komórka była skanowana, zaczynając od górnej części komórki i aż do sekcji równikowej (dla oocytów) lub do dolnej części komórki (dla komórek pęcherzykowych). Odstępy pomiędzy poszczególnymi skanami wynosiły 6 μm dla oocytów i 2 μm dla komórek pęcherzykowych.

Analiza obrazów

Uzyskane obrazy były analizowane pod kątem parametrów lipidowych [zawartość lipidów, liczba kropli lipidowych, rozmiar kropli lipidowych i powierzchnia zajmowana przez krople lipidowe (%)] za pomocą oprogramowania ImageJ Fiji w wersji v1.53c (NIH, Bethesda, MD, Stany Zjednoczone). Należy podkreślić, że parametr „zawartość lipidów” w rzeczywistości odnosi się do ilości lipidów zgromadzonych w kroplach lipidowych, a nie do całkowitej zawartości lipidów w komórce. Jednakże dla uproszczenia opisu uzyskanych wyników w dalszej części pracy stosowane będzie określenie „zawartość lipidów”.

Zawartość lipidów oceniano za pomocą następującego wzoru:

wartość sumarycznej intensywności* - (wartość całkowitej powierzchni komórki × wartość fluorescencji tła)

*sumaryczna intensywność (ang. integrated density, IntDent) - suma wartości pikseli w określonym obszarze.

Pozostałe parametry (liczba LD, rozmiar i powierzchnia) były mierzone przy użyciu komendy „analyze particle”, która rozpoznaje i odczytuje sygnały fluorescencyjne wyróżniające się ponad tło zdjęcia. Powierzchnia zajmowana przez krople lipidowe (%) była automatycznie obliczana na podstawie stosunku sygnału fluorescencyjnego do braku sygnału. Dodatkowe użycie komendy „watershed” umożliwiło eliminację możliwych skupisk LD generowanych przez oprogramowanie Fiji. Parametr „rozmiar kropli lipidowych” został określony przez program poprzez zmierzenie średnicy kropli lipidowych. Dla wszystkich analizowanych parametrów wartość każdej warstwy była obliczana osobno.

Analiza Real-Time PCR

Każda próba komórek pęcherzykowych i oocytów pochodziła z grupy 25 COC, które były poddane dojrzewaniu *in vitro* w jednym dołku. Po 22 godzinach dojrzewania, oocyty zostały oczyszczone z komórek pęcherzykowych przez energiczne pipetowanie. Komórki pęcherzykowe zostały przeniesione do probówek Eppendorf, odwirowane, usunięto supernatant, a komórki zamrożono w -196°C. Całkowicie oczyszczone z komórek pęcherzykowych oocyty przeniesiono do probówek Eppendorf i zamrożono w -196°C. Próby przechowywano w temperaturze -80°C do rozpoczęcia eksperymentów.

Całkowite RNA zostało wyizolowane za pomocą zestawu High Pure miRNA Isolation Kit (Roche, Bazylea, Szwajcaria) zgodnie z wytycznymi producenta. Precypitacja RNA została przeprowadzona przy użyciu NF Pellet Paint Co-Precipitant. Do każdej próby RNA dodano 1 μ L Pellet Paint, 10 μ L 3 M octanu sodu i 200 μ L 96% etanolu. Po inkubacji próby poddano wirowaniu przy 18 000 g. Osad RNA został przepłukany i odwirowany w 75% i 96% etanolu, a następnie wysuszony w temperaturze 40°C. Ostatecznie, RNA zostało rozpuszczone w 8 μ L wody i ocenione za pomocą Nanodropa 2000c (Thermo Fisher Scientific). Następnie przeprowadzono odwrotną transkrypcję na całkowitym wyizolowanym RNA, wykorzystując zestaw Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit (Roche, Warszawa, Polska) zgodnie z protokołem producenta. Uzyskane próby cDNA zostały rozcieńczone 1:1 w wodzie i przechowywane w -20°C do dalszej analizy. Analizę PCR w czasie rzeczywistym przeprowadzono metodą krzywej standardowej. Początkowo produkt każdego genu uzyskano za pomocą PCR i rozdzielono na żelu agarozowym 1,5%. Następnie produkt PCR został wyizolowany i oczyszczony za pomocą zestawu GeneJET Gel Extraction Kit (Molecular Biology, ThermoFisher Scientific). Stężenie DNA zostało określone za pomocą Nanodropa 2000c (Thermo Fisher Scientific). Przygotowano dziesięciokrotne rozcieńczenia standardów DNA (zakres 10aM od do 0,00001aM). Te standardy następnie zastosowano w reakcjach PCR w czasie rzeczywistym, aby wygenerować odpowiednie krzywe standardowe, przy pomocy oprogramowania LightCycler 480 II (Roche). Reakcje przeprowadzono w systemie LightCycler 480 II, używając odczynników LightCycler 480 Probes Master (Roche). Mieszanina reakcyjna 20 μ L składała się z 10 μ L LightCycler Master, 4 μ L starterów (5 μ M), 4 μ L wody PCR-pure i 2 μ L cDNA. Warunki reakcji były następujące: denaturacja w 95°C przez 5 minut; amplifikacja (40 cykli) w 95°C przez 10 s, 60°C przez 10 s i 72°C przez 10 s; końcowe schłodzenie w 40°C. Za pomocą tej metody oceniano względne stężenie mRNA genów odpowiedzialnych za metabolizm kwasów tłuszczowych [Syntaza kwasów tłuszczowych (*FASN*), Receptor aktywowany przez proliferatory peroksysomów α (*PPARA*), Perilipina 2 (*PLIN2*)], metabolizm glukozy [Karboksylaza acetylo-CoA α (*ACACA*), Transporter glukozy 1 (*GLUT1*)] oraz jakość COC [Czynnik różnicowania wzrostu (*GDF9*)]. Każda próba cDNA była analizowana w dwóch powtórzeniach dla każdego genu, a uzyskana średnia wartość była używana do określenia względnej ilości transkryptów w porównaniu z geometryczną średnią genów referencyjnych [Dehydrogenaza aldehydu 3-fosfoglicerynowego (*GAPDH*) i Białko adapterowe 14-3-3-zeta (*YWHAZ*)] (lista starterów wraz z danymi szczegółowymi - Materiał uzupełniający nr 1, Lipińska et al. 2025).

Profilowanie lipidowe blastocyst

Do analizy lipidomicznej wybrano wyłącznie wylęgnięte blastocysty po 9 dniach hodowli. W ramach każdej grupy analizowano 6 indywidualnych blastocyst pochodzących z trzech niezależnych powtórzeń. Każdą blastocystę przepłukano w PBS, przeniesiono do próbówki Eppendorf w minimalnej objętości cieczy i zamrożono w temperaturze -196°C . Próbkę przechowywano w -80°C .

W celu przeprowadzenia ekstrakcji lipidów z blastocyst, zebrane próbki rozmrożono i wymieszano z ultraczystą wodą. Następnie poddano wirowaniu za pomocą vortexu w celu indukcji lizy komórek. Następnie dodano metanol (stopień czystości HPLC) i chloroform (stopień czystości HPLC), dokładnie wymieszano pipetowaniem, aby uzyskać jednofazowy roztwór i inkubowano w temperaturze pokojowej. Po inkubacji dodano ultraczystej wody i chloroform, ponownie wymieszano pipetowaniem, a mieszaninę zwirowano. Otrzymane fazy niepolarne i polarne starannie przeniesiono do nowych probówek i suszono w koncentratorze próżniowym (SpeedVac) przez około 4 godziny w temperaturze pokojowej. Wysuszone ekstrakty lipidowe przechowywano w zamrażarce w -80°C do dalszej analizy i eksperymentów.

Ekstrakty lipidowe rozcieńczono w 30 μL mieszaniny acetonitryl/metanol/octan amonu 300 nM w proporcji 3:6,65:0,35 (v/v/v), aby osiągnąć końcowe stężenie 10 mM octanu amonu. Rozcieńczone ekstrakty lipidowe analizowano z wykorzystaniem spektrometru masowego (QQQ 6410, Agilent Technologies). Dla każdego zarodka uzyskano listę wykrytych lipidów. Lipidy sklasyfikowano według klas lipidowych, a następnie przeprowadzono analizy w oprogramowaniu MetaboAnalyst 6.0: analizę enrichment, analizę szlaków metabolicznych oraz analizę statystyczną (analizę krotności zmian - fold-change i analiza głównych składowych - PCA). Dane zostały przesłane w formacie CSV i znormalizowane metodą sumowania. Próg fold-change został ustalony na 1,5.

Barwienie FF-EVs

Procedura została przeprowadzona zgodnie z protokołem zestawu PKH67 Green Fluorescent Cell Linker Kit for General Cell Membrane Labeling (PKH67GL-1KT). Do 100 μL wyizolowanych FF-EVs z płynu pęcherzykowego o stężeniu wyjściowym 14,1 mg/ml dodano 125 μL rozcieńczalnika DILUENT C i wymieszano pipetowaniem. W osobnej próbówce 1 μL barwnika PKH67 zmieszano z 250 μL DILUENT C. Następnie mieszaninę dodano do zawiesiny

FF-EVs, dokładnie wymieszano pipetowaniem i inkubowano w temperaturze pokojowej przez 5 minut. Równolegle przeprowadzono dwie negatywne kontrole:

1. PBS + DILUENT C z barwnikiem PKH67.
2. FF-EVs + DILUENT C bez barwnika PKH67.

Reakcję zatrzymano poprzez dodanie FBS wolnego od EVs (Gibco™, ThermoFisher Scientific) i inkubację przez 1 minutę w temperaturze pokojowej. Następnie mieszaninę przeniesiono do probówek przeznaczonych do ultrawierowania (Thermo 5.0 mL PA Thin-Walled Tube) i wirowano przy 100000g przez 30 minut w temperaturze 4°C (Sorvall MX120+ Micro-Ultracentrifuge). Po wirowaniu osad z każdej próby zawieszono w 20 µl PBS.

Analiza poboru FF-EVs

Wybarwione fluorescencyjnie follikulosomy dodano do 500 µl pożywki do dojrzewania. Po 22 godzinach IVM oocyty zostały częściowo pozbawione komórek ziarnistych (pozostawiono 1–2 warstwy komórek wieńca promienistego) i utrwalone w 2% PFA, natomiast pozostałe komórki pęcherzykowe utrwalono w 4% PFA. W celu zobrazowania połączeń trans-zonalnych przeprowadzono dodatkową 30-minutową inkubację w 1x falloidynie (odczynnik iFluor 555, Abcam, Cambridge, Wielka Brytania). Oocyty umieszczono na szkiełkach podstawowych z pojedynczą łezką (Comex, Wrocław, Polska) w roztworze zapobiegającym wyświecaniu (ThermoFisher Scientific), przykryto i poddano analizie następnego dnia. Komórki pęcherzykowe naniesiono na szkiełko, zwirowano w wirówce Cytospin 4 (ThermoFisher Scientific), wybarwiono DAPI (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA), przykryto szkiełkiem nakrywkowym i analizowano natychmiast.

Do wizualizacji poboru follikulosomów wykorzystano konfokalny mikroskop Zeiss LSM 880. Dla barwnika PKH67 zastosowano długość fali wzbudzenia 488 nm i emisji 537 nm (laser Argon2). W przypadku barwnika DAPI (stosowanego wyłącznie dla komórek pęcherzykowych) użyto długości fali wzbudzenia 405 nm i emisji 438 nm (Laser Diode 405). Dla barwienia falloidyną długość fali wzbudzenia wynosiła 543 nm, a emisji 575 nm.

Test Wilcoxona i test Kruskala-Wallisa zastosowano do oceny istotności statystycznej. Analizy te przeprowadzono za pomocą pakietu statystycznego R (<https://cran.r-project.org/>).

3.2.2. Eksperyment nr 2

Eksperyment nr 2 (układ doświadczenia - Fig. 6) obejmował realizację celów 3-5 wyznaczonych dla niniejszej dysertacji, a uzyskane wyniki przedstawione w pracy pt. “Species and embryo genome origin affect lipid droplets in preimplantation embryos” opublikowanej w czasopiśmie *Frontiers in Cell and Developmental Biology*.

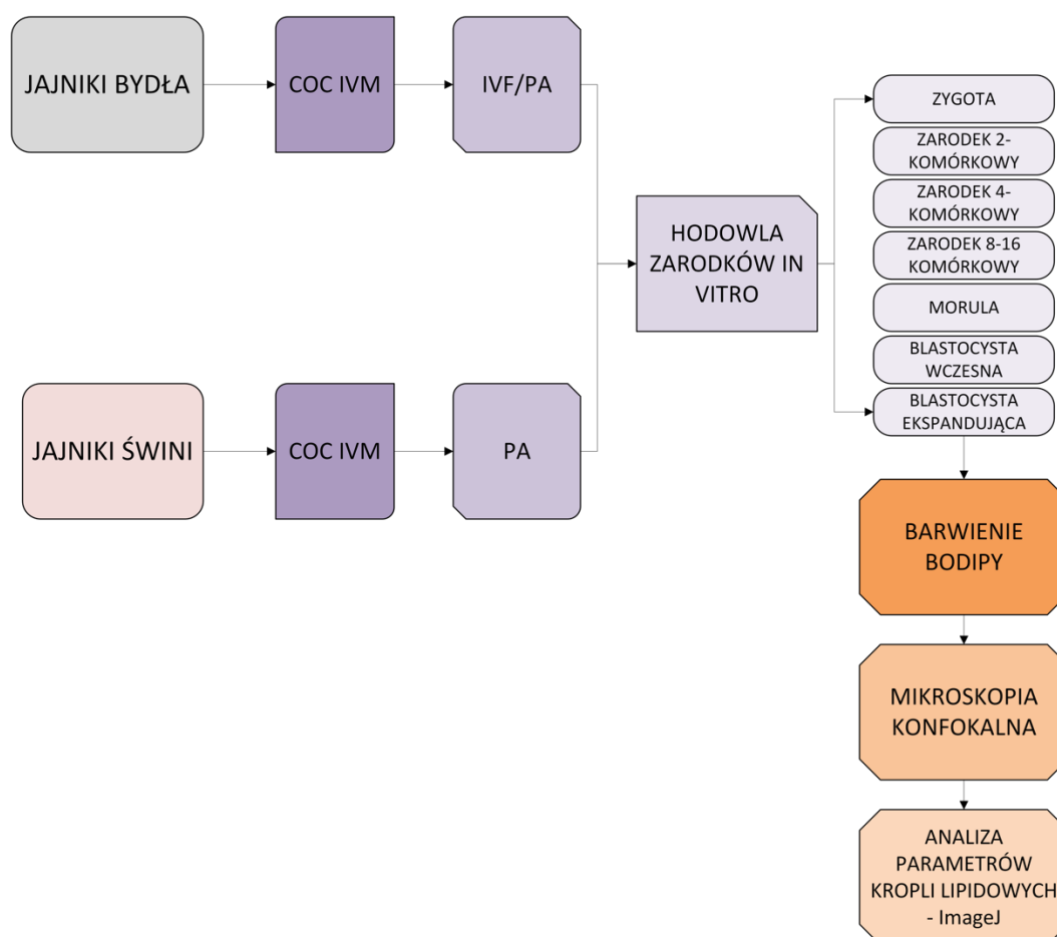


Fig. 6. Układ doświadczalny eksperymentu nr 2 (grafika własna).

Pobieranie kompleksów oocyt-cumulus

Kompleksy oocyt-cumulus zostały pozyskane z pęcherzyków jajnikowych bydła (o średnicy około 4-8mm) oraz świni (o średnicy około 2–5 mm). Niedojrzałe COC pobierano metodą aspiracji za pomocą igły i strzykawki, a następnie analizowano morfologicznie w pożywce HEPES. Do eksperymentu wybrano COC bez oznak degradacji cytoplazmy, ściśle przylegające do osłonki przejrzystej i otoczone co najmniej 3–4 warstwami komórek ziarnistych.

Dojrzewanie in vitro

Dojrzewanie *in vitro* oocytów bydła przeprowadzono przez 24h w 500 μ L pożywki w warunkach 39°C, 5% CO₂ i maksymalnej wilgotności. Kompleksy oocyt-cumulus dojrzewały w pożywce TCM199+Glutamax (Gibco, Thermo Fisher Scientific, MA, Stany Zjednoczone) wzbogaconej o 6 mg/mL fafBSA (albumina surowicy bydlęcej wolna od kwasów tłuszczowych), 0,25 mM pirogronianu sodu, 1x stężony roztwór penicyliny-streptomycyny, 2 μ g/mL FSH oraz 1 μ g/mL β -estradiolu.

W przypadku dojrzewania oocytów świń, przez pierwsze 24 godziny stosowano medium NCSU-23 (North Carolina State University Medium-23) wzbogacone hormonami: 10 U PMSG (gonadotropina surowicy źrebnej, Chorulon, MSD Animal Health, NL, USA), 10 U hCG (Folligon, MSD Animal Health, NL, USA) oraz 10% płynu pęcherzykowego. Następnie COC przenoszono do świeżego medium bez hormonów na kolejne 20 godzin. Po zakończeniu dojrzewania COC zostały pozbawione komórek pęcherzykowych i poddane aktywacji partenogenetycznej (zarówno COC świni jak i bydła) lub zapłodnieniu *in vitro* (COC bydła) w obecności komórek ziarnistych.

Zapłodnienie in vitro (IVF)

Nasienie pozyskane od dwóch buhajów zostało zakupione w komercyjnej stacji unasienniania. Ruchliwą frakcję plemników wyselekcjonowano za pomocą systemu BoviPure™ zgodnie z protokołem producenta (Nidacon, Mölndal, Szwecja). Nasienie zostało rozmrożone i odwirowane w dwóch warstwach roztworu BoviPure™ (80% i 40%), a następnie osad przepłukano w roztworze BoviWash™. Końcowe stężenie plemników określono pod mikroskopem (Nikon YS2-T) w komorze Bürkera (BRANDT). Inkubację gamet przeprowadzono przy stężeniu plemników wynoszącym 1×10^6 /ml przez 20 godzin w 500 μ l

kroplach. Pożywka do IVF została wzbogacona o PHE (penicylinę, hipotaurynę, epinefrynę) (Parrish et al., 1986).

Aktywacja partenogenetyczna (PA)

Aktywacja partenogenetyczna oocytów bydłych i świńskich została przeprowadzona poprzez inkubację w 5 μ M jonomycynie w pożywce TALP przez 5 minut. Następnie, oocyty inkubowano przez 4 godziny w 2mM 6-DMAP (6-(Dimetyloamino)puryna) w końcowej pożywce do hodowli zarodków, wzbogaconej o BSA.

Hodowla zarodków

Po zakończeniu procedury zapłodnienia pozaustrojowego lub aktywacji partenogenetycznej, zarodki zostały przeniesione w grupach po 25-30 do kolejnych 70 μ l kropli pożywki SOF+fafBSA (dla bydła; Warzych et al, 2020) lub NCSU-23+FBS (dla świni; Pawlak et al., 2020), przykrytych olejem mineralnym. W 5. dniu hodowli połowa objętości kropli hodowlanej została wymieniona na świeżą pożywkę.

Zarodki w kolejnych etapach rozwoju przedimplantacyjnego (zygota, zarodek 2-komórkowy, zarodek 4-komórkowy, 8-16-komórkowy, morula, wczesna blastocysta, blastocysta) były zbierane w określonych punktach czasowych wymienionych w Tabeli 1 (Lipińska et al. 2023). Dokładne punkty czasowe podziałów zarodków zostały wybrane *a priori* na podstawie danych literaturowych i wcześniejszych doświadczeń laboratoryjnych. W układzie doświadczalnym zaplanowano trzy grupy eksperymentalne:

- b.IVF - zarodki bydłce uzyskane po zapłodnieniu *in vitro*,
- b.PA - zarodki bydłce uzyskane po aktywacji partenogenetycznej,
- p.PA - zarodki świńskie uzyskane po aktywacji partenogenetycznej.

Barwienie kropli lipidowych

Zarodki zostały utrwalone w 500 μ L 4% paraformaldehydu i przechowywane w temperaturze 4°C. Następnie, utrwalone zarodki były permeabilizowane roztworem 0,2% Triton X-100 przez 20 minut w temperaturze pokojowej. Do wybarwienia kropli lipidowych użyto barwnika BODIPY 493/503 w stężeniu 20 μ g/mL (Thermo Fisher Scientific, MA, USA) i inkubowano w temperaturze pokojowej przez 1 godzinę, w ciemności. Chromatyna została zwizualizowana

przez barwienie roztworem 0,5 µg/mL Vectashield DAPI (4',6-diamidino-2-fenyloindol; DAPI; Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA).

Zarodki (od zygot po wczesne blastocysty) zostały utrwalone na szkiełkach mikroskopowych z pojedynczą łezką (Comex, PL). Dla ekspandujących blastocyst użyto płytek µ-Slide, 18 Well-Flat ibiTreat (ibidi, GmbH, Niemcy) z poli-L-lizyną zamiast szkiełek mikroskopowych, w celu uzyskania właściwego bocznego ustawienia blastocysty (wizualizacja zarówno węzła zarodkowego jak i trofektodermy).

Analiza mikroskopowa

Wybarwione zarodki były analizowane za pomocą mikroskopu konfokalnego Zeiss LSM 880, wykorzystującego filtr 488 nm z pasmem przepustowym 500–550 nm do barwnika BODIPY 493/503 (laser Argon2), 420–480 nm do barwnika DAPI (laser Diode 405) z obiektywem LD LCI Plan Apochromat 40x/1.2 Imm Korr DIC 27 (Zeiss, Niemcy).

Każdy zarodek był obrazowany w odstępach 5 µm, począwszy od górnej warstwy (z pierwszym uchwyceniem LD) do sekcji równikowej. Ekspandujące blastocysty były umieszczone na szkiełku w taki sposób, aby umożliwić konfokalną wizualizację zarówno węzła zarodkowego (ICM), jak i trofektodermy (TE). Komórki ICM i TE były rozróżniane na podstawie kształtu komórek. Komórki określane jako komórki ICM były mniejsze, zaokrąglone o gęstym upakowaniu przy jednej ścianie blastocysty, natomiast komórki TE były większe, o kształcie wydłużonym i zlokalizowane w zewnętrznej warstwie blastocysty.

Analiza obrazów

Uzyskane obrazy były analizowane pod kątem parametrów lipidowych [zawartość lipidów, liczba kropli lipidowych, wielkość kropli lipidowych i powierzchnia zajmowana przez krople lipidowe (%)] za pomocą oprogramowania ImageJ Fiji w wersji v1.53c (NIH, Bethesda, MD, USA) wg procedury opisanej w podrozdziale 3.2.1 na stronie nr 34.

Każde zdjęcie w obrębie zarodka było osobno analizowane (dla wszystkich badanych parametrów), a ich średnia wartość stanowiła ostateczny wynik obliczeń. Pozwoliło to uniknąć wysokiej zmienności spowodowanej różnicami w rozmiarze zarodków w różnych etapach rozwoju. Aby przeanalizować zawartość lipidów w węźle zarodkowym w odniesieniu do całej

blastocysty, przeprowadzono dodatkowy pomiar wyłącznie w obrębie węzła zarodkowego, a następnie zestawiono go z pomiarem dla całej blastocysty.

Analiza statystyczna

Analizę rozkładu danych zebranych zarodków przeprowadzono za pomocą testu Shapiro-Wilka, a porównanie istotności statystycznej za pomocą testu Wilcozona oraz testu Kruskala-Wallisa w pakiecie statystycznym R (<https://cran.r-project.org/>). Porównanie ICM ekspandujących blastocyst wykonano za pomocą testu chi-kwadrat.

4. Wyniki

4.1. Eksperyment 1

Charakterystyka follikulosomów

Charakterystykę follikulosomów przeprowadzono za pomocą trzech metod: analizy Nanoparticle Tracking Analysis, Western Blot oraz z wykorzystaniem mikroskopii transmisyjno-elektronowej. Analiza NTA wykazała, że rozmiary cząsteczek FF-EVs wahały się od 30 do 450 nm (Fig. 1A, Lipińska et al. 2025). Średnia wielkość cząsteczek wynosiła $166,2 \pm 2$ nm, modalna (najczęściej występująca wartość) – $133,5 \pm 8,9$ nm, a odchylenie standardowe – $68,1 \pm 2,7$ nm. Koncentracja wyniosła około $1,34 \times 10^{10}$ cząsteczek/ml. Dodatkowo, analiza TEM ujawniła obecność FF-EVs w podobnym zakresie rozmiarów, co analiza NTA (Fig 1B, Lipińska et al. 2025). Analiza Western Blot potwierdziła obecność białek markerowych związanych z błoną FF-EVs (CD63, CD9 oraz TSG101; Fig. 1C, Lipińska et al. 2025).

Zwiększenie poboru follikulosomów przez komórki pęcherzykowe w warunkach stresu metabolicznego

Do analizy intensywności poboru FF-EVs przez kompleksy oocyt-cumulus zastosowano dwa podejścia. W celu oceny internalizacji FF-EVs w obrębie COC zeskanowano od 10 do 15 kompleksów COC częściowo oczyszczonych z komórek pęcherzykowych, pochodzących z każdej grupy eksperymentalnej (CON+, IODH+, ETO+), przy trzykrotnym powtórzeniu dla każdej grupy. Obrazy mikroskopii konfokalnej wskazały, że sygnały dla FF-EVs znajdowały się zarówno w komórkach pęcherzykowych, jak i w obrębie osłonki przejrzystej, przestrzeni okołozółtkowej oraz w cytoplazmie oocyta. Dodatkowe barwienie falloidyną umożliwiło zobrazowanie połączeń trans-zonalnych w obrębie osłonki przejrzystej i tym samym wykazanie, że droga wnikania FF-EVs do oocyta jest realizowane przez TZPs (Fig. 2A-F, Lipińska et al. 2025). Wnikanie follikulosomów do wnętrza COC było widoczne zarówno w grupie kontrolnej jak i w grupach z zastosowanymi inhibitorami (Fig. 3A, Lipińska et al. 2025).

W celu dokonania pomiarów ilościowych poboru follikulosomów przez komórki pęcherzykowe przeanalizowano łącznie 3797 komórek z trzech grup, z trzema powtórzeniami w każdej grupie: CON+ (n=1188), ETO+ (n=1314) i IODH+ (n=1295). Analiza koncentrowała się na proporcji pomiędzy liczbą komórek pęcherzykowych FF-EVs-pozytywnych (komórek,

które zgromadziły follikulosomy w cytoplazmie, Fig. 3B, Lipińska et al. 2025) a całkowitą liczbą ocenianych komórek. Dane wskazały, że zarówno w grupie komórek hodowanych z inhibitorami metabolizmu glukozy ($94\% \pm 3$, $p < 0,01$), jak i w grupie komórek hodowanych z inhibitorami metabolizmu lipidów ($92\% \pm 3$, $p < 0,05$) istotnie więcej komórek pęcherzykowych pozyskiwało FF-EVs z pożywki w porównaniu do grupy kontrolnej ($79\% \pm 7$, Fig 3C, Lipińska et al. 2025).

Follikulosomy wspomagają dojrzewanie oocyta i wylęganie blastocyst w warunkach zaburzonego metabolizmu energetycznego

Suplementacja follikulosomami w płynie pęcherzykowym nie miała istotnego wpływu na poziom dojrzewania jądrowego mierzonego jako procent oocytów, które osiągnęły stadium metafazy II (wskaźnik MII, *ang. metaphase II rate*), w warunkach kontrolnych (76% i 72%, CON+ vs CON). Jednakże suplementacja pożywki IVM follikulosomami przy jednoczesnym zastosowaniu inhibitorów metabolizmu lipidów/glukozy lub lipidów zwiększyła wskaźnik MII w obu grupach eksperymentalnych: z 48% do 83% w grupie IODH+ ($p < 0,01$) oraz z 53% do 70% w grupie ETO+ ($p < 0,05$) w porównaniu do grup kontrolnych (odpowiednio IODH i ETO) (Fig. 4; Lipińska et al. 2025).

Nie stwierdzono istotnych różnic w odsetku zarodków ulegających podziałom mitotycznym (*ang. cleavage rate*) między grupami badawczymi. Jeśli chodzi o wskaźnik tworzenia blastocyst (*ang. blastocyst rate*; procent zarodków, które osiągnęły stadium blastocysty), tylko grupa IODH+ wykazała statystycznie istotny wzrost ($p < 0,01$) w porównaniu do grupy bez suplementacji (odpowiednio 22% i 9%). Istotne różnice zaobserwowano we wskaźniku wylęglých blastocyst (*ang. hatched blastocyst rate*; procent wylęglých blastocyst w stosunku do wszystkich zarodków w stadium blastocysty) wśród wszystkich grup suplementowanych. W porównaniu do grup bez suplementacji, grupy CON+, IODH+ i ETO+ wykazały wzrost o 22% ($p < 0,01$), 17% ($p < 0,01$) oraz 12% ($p < 0,05$) (Fig. 4, Lipińska et al. 2025).

Follikulosomy wpływają na parametry kropli lipidowych w oocytach i komórkach pęcherzykowych

Krople lipidowe zostały przeanalizowane w 366 komórkach pęcherzykowych (CON n=60, CON+ n=60, IODH n=63, IODH+ n=60, ETO n=61, ETO+ n=62) oraz 243 oocytach (CON n=38, CON+ n=39, IODH n=48, IODH+ n=40, ETO n=38, ETO+ n=40). Analizy

przeprowadzono w czterech powtórzeniach biologicznych. Oceniano cztery parametry kropli lipidowych: zawartość lipidów, rozmiar kropli lipidowych, liczbę kropli lipidowych oraz powierzchnię jaką zajmują krople lipidowe w komórce (wyznaczoną w %) (Fig. 5, Lipińska et al. 2025).

Analiza kropli lipidowych w komórkach pęcherzykowych z grupy kontrolnej (CON+ vs CON), pokazała, iż suplementacja FF-EVs zwiększyła poziom lipidów zawartych w LD oraz liczbę kropli lipidowych, a także zmniejszyła rozmiar kropli lipidowych. W grupie IODH suplementacja FF-EVs doprowadziła do zmniejszenia zawartości lipidów, zwiększenia liczby kropli lipidowych oraz powierzchni kropli lipidowych, bez zmian w rozmiarze kropli lipidowych. W grupie ETO suplementacja FF-EVs zwiększyła zawartość lipidów oraz powierzchnię kropli lipidowych, bez zmian w liczbie kropli lipidowych i ich rozmiarze (Fig. 5A, Lipińska et al. 2025).

W oocytach nie wykryto różnic między grupą CON+ a CON w żadnym z analizowanych parametrów. Porównując warunki IODH+ i IODH, zaobserwowano spadek zawartości lipidów po suplementacji FF-EVs. Podobnie, porównując grupy ETO+ i ETO, rozmiar kropli lipidowych wykazał znaczący spadek po suplementacji (Fig. 5B, Lipińska et al. 2025).

Suplementacja follikulosomami wpływa na względny poziom transkryptów genów związanych z metabolizmem energetycznym

Względny poziom transkryptów wybranych genów zaangażowanych w metabolizm energetyczny został przeanalizowany w 36 próbach komórek pęcherzykowych (6 powtórzeń na grupę) oraz 36 próbach oocytów (6 powtórzeń na grupę; Fig. 6, Fig. 7, Lipińska et al. 2025).

W komórkach pęcherzykowych grupa CON+ wykazała istotne zwiększenie poziomu mRNA *GLUT1* oraz *ACACA*. Podczas dojrzewania w obecności inhibitorów metabolizmu glukozy suplementacja FF-EVs spowodowała obniżenie poziomu mRNA *ACACA* oraz *PPARA*. W warunkach inhibicji metabolizmu kwasów tłuszczowych jedyną istotną obserwacją było zwiększenie ekspresji *ACACA* w grupie ETO+ vs ETO (Fig. 6, Lipińska et al. 2025).

W oocytach grupa CON+ wykazała obniżenie poziomu mRNA *GLUT1*, *ACACA* i *PLIN2*, podczas gdy ekspresja *GDF9* pozostała niezmienną. Zaobserwowano również spadek

poziomu mRNA *ACACA* i *PLIN2* w grupie IODH+ vs IODH. W grupie ETO+ vs ETO stwierdzono istotny spadek ekspresji *GDF9* (Fig. 7, Lipińska et al. 2025).

Suplementacja follikulosomami podczas dojrzewania in vitro zmienia profile lipidowe i ścieżki metaboliczne w blastocystach

Analiza lipidomiczna została przeprowadzona w blastocystach pochodzących z oocytów dojrzewających w grupach eksperymentalnych – zarówno suplementowanych (IODH+, n=6; ETO+, n=6), jak i niesuplementowanych (IODH, n=6; ETO, n=6). W wyniku analizy, na podstawie stosunku masy do ładunku (m/z ratio), parametru specyficznego dla każdego związku identyfikowanego w spektrometrii mas, zidentyfikowano łącznie 207 różnych gatunków lipidów, sklasyfikowanych w 9 podklasach (fosfatydylocholina, sfingomielina, fosfatydyloetanolamina, fosfatydyloinozytol, fosfatydyloseryna, fosfatydyloglicerol, trójglicerydy, acylokarnityny, estry cholesterolu), co szczegółowo przedstawiono w Tabeli nr 1. Trzy podklasy lipidów, które w największym stopniu występowały w analizowanych blastocystach to fosfatydylocholina, fosfatydyloetanolamina i triacyloglicerole. Przy użyciu oprogramowania MetaboAnalyst 6.0 porównano grupy IODH+ vs IODH oraz ETO+ vs ETO. Wykonano analizę krotności zmian (fold change analysis), analizę wzbogacenia ścieżek metabolicznych (ang. enrichment) oraz analizę głównych składowych (PCA), aby wykryć różnice w profilach lipidowych i potencjalne ścieżki metaboliczne zmienione w badanych warunkach eksperymentalnych.

Podklasy lipidów	Liczba wykrytych gatunków lipidów
Fosfatydylocholina (PC)	52
Fosfatydyloetanolamina (PE)	48
Triacyloglicerole (TG)	42
Acylokarnityny	19
Fosfatydyloseryna (PS)	15
Fosfatydyloglicerol (PG)	11
Sfingomielina (SM)	7
Fosfatydyloinozytol (PI)	7
Estry cholesterolu (CE)	6

Tab.1. Tabela podklas lipidów zidentyfikowanych w analizie lipidomicznej wraz z liczbą poszczególnych gatunków lipidów należących do każdej z nich.

Analizy statystyczne wykazały, że w grupie IODH⁺ w porównaniu do IODH, poziom 22 gatunków lipidów uległ obniżeniu, natomiast 2 gatunki lipidów miały podwyższony poziom (Materiał uzupełniający nr 2, Lipińska et al. 2025). Największy spadek dotyczył acylokarnityn – aż 15 gatunków lipidów należących do tej podklasy wykazało zmniejszone stężenie. Ponadto istotne zmiany zaobserwowano dla czterech gatunków lipidów zaklasyfikowanych do trójglicerydów (TG), trzech gatunków lipidów zaklasyfikowanych do fosfatydylocholin (PC) oraz jednego lipidu będącego fosfatydyloetanolaminą (PE) (Fig). Lipidy o podwyższonym poziomie należały do fosfatydyloetanolamin (1) oraz acylokarnityn (1) (Fig. 8A, Lipińska et al. 2025). Analiza głównych składowych została przeprowadzona dla podklasy acylokarnityn, ponieważ wykazały one największe zmiany. Wyniki wykazały 74,6% różnorodności w obrębie tej podklasy (Fig 8B, Lipińska et al. 2025). Analiza wzbogacenia ścieżek metabolicznych wskazała na dwa istotnie zmienione szlaki metaboliczne: biosyntezę fosfolipidów oraz metabolizm kwasu arachidonowego.

W porównaniu warunków ETO⁺ i ETO, (Fig. 8C, Lipińska et al. 2025) stwierdzono, że łącznie 65 gatunków lipidów (Materiał uzupełniający nr 3, Lipińska et al. 2025) uległo istotnemu podwyższeniu. Wśród tych lipidów najliczniej reprezentowaną grupą były fosfatydylocholiny (PC), z 19 przedstawicielami o zwiększonej zawartości. Ponadto fosfatydyloetanolaminy (PE) wykazały istotne podwyższenie poziomu, z 13 gatunkami lipidów tej podklasy o zwiększonej zawartości. Analiza głównych składowych została przeprowadzona osobno dla podklas lipidowych fosfatydyloetanolamin (PE) oraz fosfatydylocholin (PC). Wyniki wykazały

odpowiednio 64,4% oraz 96,6% różnorodności w obrębie tych klas (Fig. 8D, Lipińska et al. 2025). Analiza ścieżek metabolicznych wykazała istotne wzbogacenie w: biosyntezę fosfolipidów oraz metabolizm kwasu arachidonowego, co było zgodne z wynikami obserwowanymi w grupie IODH+.

4.2. Eksperyment 2

Zarodki pochodzące zarówno z systemów IVF, jak i PA, na każdym etapie rozwoju były zbierane z 3 do 5 powtórzeń doświadczeń *in vitro*. Odsetek zarodków ulegających pierwszemu podziałowi mitotycznemu oraz wskaźnik tworzenia blastocysty wynosił: b.IVF – 80% i 20%, b.PA – 79% i 17%, p.PA – 70% i 26%.

Charakterystyka lipidowa zarodków bydła pochodzących z systemu IVF

Parametry lipidowe (zawartość lipidów, liczba kropli lipidowych, rozmiar kropli lipidowych oraz procentowy obszar zajmowany przez krople lipidowe w zarodku) zostały przeanalizowane w 131 indywidualnych zarodkach bydlęcych w systemie IVF (b.IVF). Analizę przeprowadzono na 7 etapach rozwoju zarodków (zygota, n = 19; zarodek 2-komórkowy, n = 18; zarodek 4-komórkowy, n = 20; zarodek 8–16-komórkowy, n = 18; morula, n = 22; wczesna blastocysta, n = 20; ekspandująca blastocysta, n = 15). Wizualizacja konfokalna i analiza komputerowa ujawniły liczne istotne zmiany między kolejnymi etapami rozwoju. Porównanie każdego etapu rozwoju zarodka w stosunku do poprzedniego przedstawiono na Figurze 1 (Lipińska et al. 2023) (zarodek 2-komórkowy vs. zygota, zarodek 4-komórkowy vs. zarodek 2-komórkowy, zarodek 8–16-komórkowy vs. zarodek 4-komórkowy, morula vs. zarodek 8–16-komórkowy, wczesna blastocysta vs. morula, ekspandująca blastocysta vs. wczesna blastocysta).

Zaobserwowano, że dwa parametry: zawartość lipidów oraz obszar zajmowany przez krople lipidowe w obrębie pojedynczego zarodka, zmniejszają swoje wartości we wczesnych etapach rozwojowych, osiągając najniższy poziom na etapie 8–16-komórkowym. Najwyższą zawartość lipidów obserwuje się na etapie 4-komórkowym. Liczba kropli lipidowych stopniowo maleje od zygoty do etapu 8–16-komórkowego, jednak na etapie blastocysty ekspandującej następuje jej istotny wzrost. Rozmiar kropli lipidowych osiąga najwyższą wartość w zygotie, po czym następuje znaczący spadek na etapie 4-komórkowym, a następnie utrzymuje się na stałym poziomie w kolejnych stadiach rozwojowych.

Charakterystyka lipidowa zarodków bydła pochodzących z systemu PA

Parametry lipidowe zostały przeanalizowane w 123 indywidualnych partenogenetycznych zarodkach bydłych (b.PA) na 7 etapach rozwojowych (zygota, n = 19; zarodek 2-komórkowy, n = 20; zarodek 4-komórkowy, n = 14; zarodek 8–16-komórkowy, n = 18; morula, n = 22; wczesna blastocysta, n = 15; blastocysta ekspandująca, n = 15). Porównanie każdego etapu rozwoju zarodka w stosunku do poprzedniego przedstawiono na Figurze 2 (Lipińska et al. 2023) (zarodek 2-komórkowy vs. zygota, zarodek 4-komórkowy vs. zarodek 2-komórkowy, zarodek 8–16-komórkowy vs. zarodek 4-komórkowy, morula vs. zarodek 8–16-komórkowy, wczesna blastocysta vs. morula, ekspandująca blastocysta vs. wczesna blastocysta).

Zaobserwowano istotny spadek zawartości lipidów oraz liczby kropli lipidowych na etapie wczesnej blastocysty, po którym nastąpił gwałtowny wzrost na etapie ekspandującej blastocysty. Analiza wykazała również, że rozmiar kropli lipidowych osiągnął najniższą wartość na etapie zygoty, następnie znacząco wzrósł na etapie 2-komórkowym, pozostając stabilnym w kolejnych etapach rozwoju.

Charakterystyka lipidowa zarodków świni pochodzących z systemu PA

Parametry lipidowe zostały przeanalizowane w 130 indywidualnych zarodkach partenogenetycznych świni (p.PA) na 7 etapach rozwoju (zygota, n = 21; zarodek 2-komórkowy, n = 21; zarodek 4-komórkowy, n = 19; zarodek 8–16-komórkowy, n = 21; morula, n = 17; wczesna blastocysta, n = 20; rozszerzona blastocysta, n = 11). Porównanie każdego etapu rozwoju zarodka względem poprzedniego przedstawiono na Figurze 3 (Lipińska et al. 2023) (zarodek 2-komórkowy vs. zygota, zarodek 4-komórkowy vs. zarodek 2-komórkowy, zarodek 8–16-komórkowy vs. zarodek 4-komórkowy, morula vs. zarodek 8–16-komórkowy, wczesna blastocysta vs. morula, ekspandująca blastocysta vs. wczesna blastocysta).

Stadium ekspandującej blastocysty charakteryzowało się najwyższymi wartościami wszystkich analizowanych parametrów. Zawartość lipidów zmniejszała się na etapie 8–16-komórkowym oraz moruli, osiągając najwyższe wartości w ekspandującej blastocysty. Stopniowy wzrost liczby kropli lipidowych obserwowano od etapu zygoty aż do etapu ekspandującej blastocysty, gdzie osiągnięto najwyższe wartości.

Porównanie parametrów kropli lipidowych w zarodkach pochodzących z zapłodnienia in vitro vs aktywacja partenogenetyczna

Jedną z ważniejszych różnic między grupami b.IVF i b.PA jest istotnie niższy poziom zawartości lipidów oraz rozmiaru kropli lipidowych w zygotach b.PA, podczas gdy liczba LD oraz średni obszar zajmowany przez LD pozostają na tym samym poziomie. Następnie, w zarodkach b.IVF na etapie 8–16-komórkowym zaobserwowano istotnie niższe wartości we wszystkich analizowanych parametrach. Rozmiar LD wzrastał od etapu 8–16-komórkowego aż do stadium blastocysty. Wyższa zawartość lipidów w ekspandującej blastocystyce b.PA wiąże się z większymi rozmiarami LD w porównaniu do b.IVF (Fig.4, Lipińska et al. 2023).

Międygatunkowe porównanie parametrów kropli lipidowych w zarodkach bydła i świni

Analiza zawartości lipidów na etapie zygoty wykazała, że poziom lipidów jest podobny między grupami b.PA i p.PA. Zarodki na etapie 2-komórkowym, 8–16-komórkowym oraz morule miały istotnie wyższy poziom lipidów w grupie b.PA. Odwrotna zależność występowała we wczesnych i ekspandujących blastocystach, gdzie zawartość lipidów była istotnie wyższa w zarodkach p.PA. Ponadto, w grupie b.PA zaobserwowano większą liczbę kropli lipidowych na etapie zygoty, 2-komórkowym oraz 8–16-komórkowym, natomiast w blastocystach p.PA liczba kropli lipidowych była istotnie wyższa. Rozmiar kropli lipidowych był większy na wszystkich etapach rozwoju zarodków p.PA. Co więcej, z wyjątkiem etapu zygoty i moruli, powierzchnia zajmowana przez krople lipidowe była większa w grupie p.PA (Fig. 5, Lipińska et al. 2023).

Porównanie zawartości lipidów w kroplach lipidowych pomiędzy węzłem zarodkowym i a całą blastocystą bydła i świni

Przeprowadzono pomiary dotyczące zawartości lipidów w węźle zarodkowym ekspandujących blastocyst w odniesieniu do całkowitej zawartości lipidów w zarodku. Wyniki wykazały, że zawartość lipidów w komórkach węzła stanowiła odpowiednio $51\% \pm 22\%$, $52\% \pm 16\%$ i $42\% \pm 23\%$ wartości odnotowanej dla całego zarodka dla grup b.IVF, b.PA i p.PA (podsumowanie w Tabeli 2). Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w parametrach ICM pomiędzy grupami. Mimo, że zawartość lipidów w blastocystyce różni się (co wykazano w porównaniach opisanych w poprzednich akapitach), wyniki dotyczące ICM wskazują, że we wszystkich

grupach lipidy są rozmieszczone w ten sam sposób – równomiernie między liniami komórkowymi węzła zarodkowego i trofektodermi.

*Blastocysty wczesne i ekspandujące świń PA posiadają najmniejszą liczbę komórek w swojej strukturze i największą zawartość lipidów w przeliczeniu na jedną komórkę – **dane nieopublikowane***

W ramach przeprowadzonej analizy określono liczbę komórek, jakimi charakteryzowały się zarodki w trzech stadiach rozwojowych: moruli, wczesnej blastocyście oraz ekspandującej blastocyście. Uzyskane wyniki porównano w obrębie poszczególnych stadiów rozwojowych pomiędzy grupami doświadczalnymi (b.IVF vs b.PA oraz b.PA vs p.PA). Następnie przeliczono zawartość lipidów na pojedynczy blastomer i uzyskane wyniki również porównano w obrębie poszczególnych stadiów rozwojowych.

Wykazano, że we wszystkich trzech stadiach rozwojowych najmniejszą liczbę komórek wykazywały zarodki partenogenetyczne świni. Najwięcej komórek w stadiach moruli oraz ekspandującej blastocysty odnotowano w zarodkach bydlęcych uzyskanych metodą IVF. Natomiast w stadium wczesnej blastocysty liczba komórek była zbliżona w grupach zarodków bydlęcych IVF oraz PA (Fig. 7A, 7B).

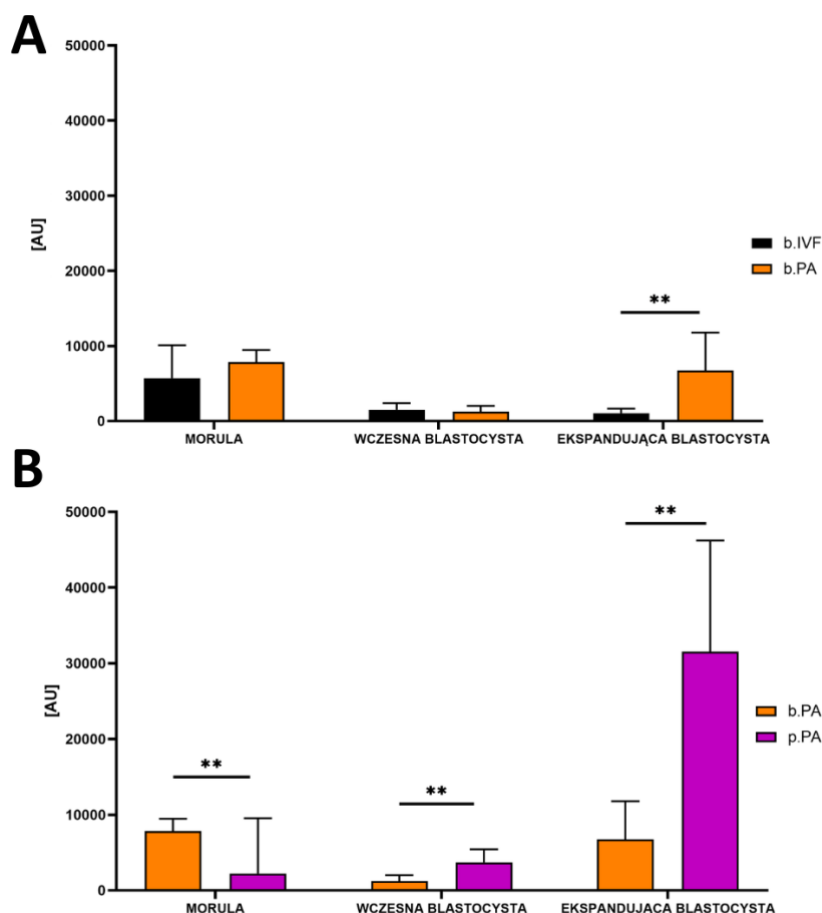


Fig. 7. Wykres przedstawiający wartości liczby blastomerów wchodzących w skład struktury zarodków ze stadiów rozwojowych moruli oraz wczesnej i ekspandującej blastocysty (średnia i odchylenie standardowe). A – porównanie b.IVF vs b.PA, B – porównanie b.PA vs p.PA;

** - $p < 0,01$

Drugim aspektem analizy była ocena zawartości lipidów przypadających na pojedynczą komórkę. W porównaniu zarodków bydłych (b.IVF vs b.PA) nie stwierdzono istotnych różnic w stadium moruli i wczesnej blastocysty, natomiast w stadium ekspandującej blastocysty istotnie wyższą zawartość lipidów odnotowano w zarodkach b.PA (Fig. 8A). W porównaniu zarodków partenogenetycznych bydła i świni, w stadium moruli istotnie więcej lipidów zawierały zarodki b.PA, natomiast w stadiach blastocyst (wczesnej i ekspandującej) większą zawartość lipidów wykazywały zarodki p.PA (Fig. 8B).

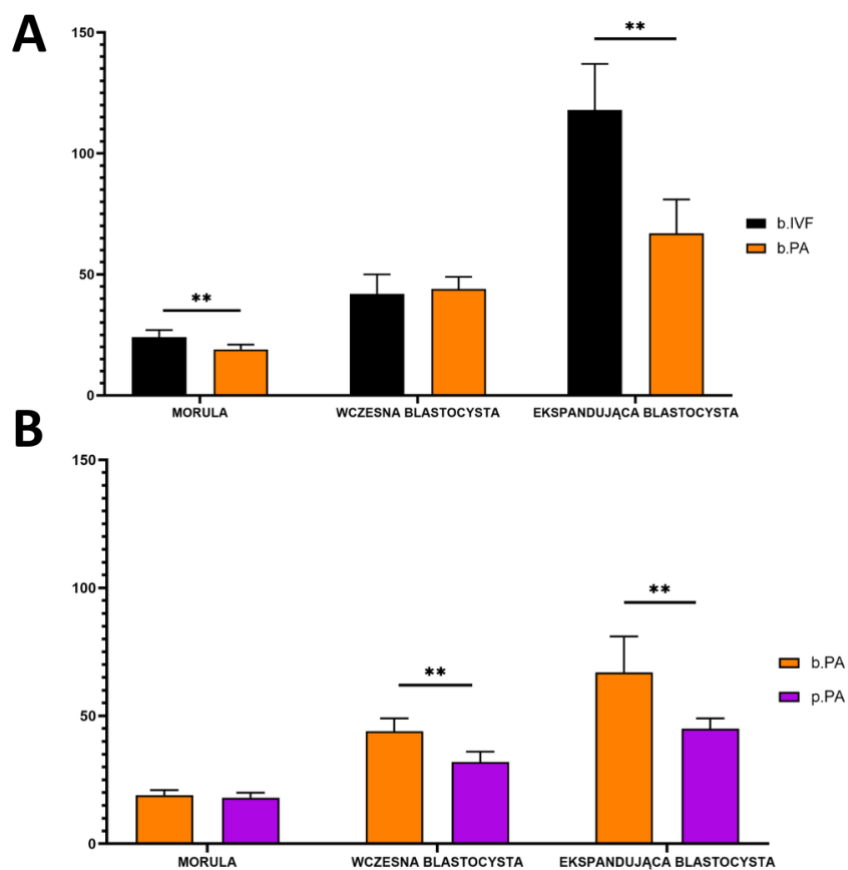


Fig. 8. Wykres przedstawiający zawartość lipidów w przeliczeniu na jedną komórkę, w trzech analizowanych stadiach rozwojowych: moruli oraz wczesnej i ekspandującej blastocystie (średnia i odchylenie standardowe). A – porównanie b.IVF vs b.PA, B – porównanie b.PA vs p.PA; ** - $p < 0.01$

4.3. Wykaz prac przeprowadzonych przez doktorantkę

Eksperyment nr 1

Wszystkie prace w ramach eksperymentu nr 1 zostały wykonane przez doktorantkę z wyłączeniem analiz wymienionych poniżej:

1. Nanoparticle Tracking Analysis, Western Blotting, Mikroskopia transmisyjno elektronowa - **dr Krishna Chaitanya Pavani**, Department of Internal Medicine, Reproduction and Population Medicine, Ghent University, Merelbeke, Belgium; współpraca w ramach grantu ERASMUS+ 2022
2. Barwienie EVs barwnikiem PKH67 - **prof. UPP, dr hab. Ewelina Warzych-Plejer**, analiza wykonana na Uniwersytecie Medycznym im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu; analiza wykonana odpłatnie.
3. Profilowanie lipidowe blastocyst - **dr Christina Ferreira**, Metabolite Profiling Facility, Purdue University, West Lafayette, USA; analiza wykonana odpłatnie.

Eksperyment nr 2

Wszystkie prace w ramach eksperymentu nr 2 zostały wykonane przez doktorantkę.

Podkreślić należy, że w hodowle zarodków (zarówno IVF jak i PA) prowadzone w obydwu eksperymentach zaangażowani byli również inni członkowie zespołu Pracowni Biotechnologii Rozrodu, Katedry Genetyki i Podstaw Hodowli Zwierząt, Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu.

5. Dyskusja

Opracowanie efektywnych strategii wspomaganego rozrodu w hodowli zwierząt, a w szczególności udoskonalenie technik dojrzewania *in vitro* i hodowli zarodków o wysokim potencjale rozwojowym, są obecnie jednymi z kluczowych obszarów badań w biologii rozrodu i embriologii zwierząt gospodarskich. Skuteczna optymalizacja tych procesów wymaga szczegółowego poznania wpływu m.in. środowiska pęcherzykowego na jakość oocytów oraz dalszy rozwój zarodkowy. Im pełniejsza będzie charakterystyka poszczególnych komponentów tego mikrośrodowiska, tym większe są szanse na jego odtworzenie w warunkach *in vitro*. Jednym z kluczowych czynników determinujących jakość kompleksów oocyt–cumulus oraz rozwijających się zarodków jest metabolizm energetyczny. Zaburzenia tego procesu obserwowane są na różnych etapach rozwoju: na poziomie pęcherzyka jajnikowego mogą prowadzić do niepełnego dojrzewania cytoplazmatycznego oocytu; w obrębie kompleksów COC skutkują obniżeniem jakości oocytów oraz zmniejszoną skutecznością zapłodnienia; natomiast na etapie zarodkowym mogą przyczyniać się do zwiększonego ryzyka poronień. Dlatego też kontynuacja badań nad wpływem zaburzeń metabolicznych na procesy dojrzewania i wczesnego rozwoju zarodków jest niezbędna dla optymalizacji procedur wytwarzania zarodków *in vitro*, szczególnie u samic dotkniętych zaburzeniami metabolicznymi, takimi jak ujemny bilans energetyczny (NEB) u krów mlecznych czy cukrzyca typu II i otyłość u kobiet.

5.1. Charakterystyka follikulosomów i ich transport w obrębie kompleksu oocyt-cumulus

Jednymi z ważniejszych celów eksperymentu nr 1 były skuteczna i precyzyjna izolacja pęcherzyków zewnątrzkomórkowych pochodzących z płynu pęcherzykowego oraz ich ilościowa i jakościowa charakterystyka, a także wskazanie drogi ich transportu w obrębie COC. Charakterystyka FF-EVs izolowanych na potrzeby tego badania została przeprowadzona zgodnie z wytycznymi zawartymi w dokumencie „Minimal information for studies of extracellular vesicles (MISEV) 2023” (Welsh et al. 2024). Rekomendacje w nim zawarte wskazały Nanoparticle Tracking Analysis jako powszechnie stosowaną techniką optyczną w dziedzinie EVs do szacowania rozmiaru i koncentracji cząsteczek; mikroskopie transmisyjno-elektronową jako nieliczną z technik zdolnych do wykrywania EVs niezależnie od ich rozmiaru; oraz Western Blot jako powszechnie stosowaną metodę wykrywania białek w preparatach zawierających EVs (Welsh et al. 2024).

Analizy Nanoparticle Tracking Analysis oraz mikroskopia transmisyjno-elektronowa wykazały, że FF-EVs miały średnią wielkość $166,2 \pm 2,0$ nm oraz średnie stężenie $1,34 \times 10^{10}$ cząsteczek/ml. Dane literaturowe pokazują różnice w raportowanych stężeniach pęcherzyków zewnątrzkomórkowych izolowanych z płynu pęcherzykowego bydła, które można przypisać metodzie izolacji oraz różnym czynnikom technicznym. Dla ultrawierowania stężenia wahają się od 10^6 (Hung et al. 2015) do 10^{10} – 10^{12} (Asaadi et al. 2021), przy czym niektórzy badacze decydują się nie ujawniać danych dotyczących liczby cząstek/ml (Ying et al. 2022). Dla porównania, metody oparte na chromatografii zazwyczaj wykazują stężenia na poziomie około 10^{12} (Asaadi et al. 2021; Bededetti et al. 2024). Różnice te mogą wynikać z potencjalnej utraty próbki podczas izolacji, zmienności w objętości końcowego izolatu lub jakości samego płynu pęcherzykowego. Natomiast średnie rozmiary EVs podawane przez różnych autorów są zbliżone do wyników uzyskanych w niniejszej pracy i mieszczą się w przedziale 30–200 nm u Hung et al. (2015), 50–250 nm u Hasan et al. (2021) lub przyjmują średnią wartość 166,9 nm u Benedetti et al. (2024). Ponadto, analiza Western Blot wykryła obecność charakterystycznych dla pęcherzyków zewnątrzkomórkowych białek markerowych. Rekomendacje MISEV (2023) dzielą białka charakterystyczne dla EV na pięć kategorii, z czego kategorie 1 i 2 uznawane są za kluczowe, ponieważ potwierdzają „obecność cech charakterystycznych dla EVs”. W ramach kategorii 1 wykrywa się białka transbłonowe, związane z błoną komórkową i/lub endosomami, takie jak tetraspaniny CD9 i CD63, które zostały zidentyfikowane w niniejszym doświadczeniu. Kategoria 2 obejmuje białka cytoplazmatyczne obecne w EVs, wykazujące zdolność wiązania lipidów lub białek błonowych — do których należy m.in. TSG101, również wykryty w ramach tego badania (Welsh et al., 2024). Uzyskane wyniki są zgodne z wcześniejszymi doniesieniami dotyczącymi bydła (Hung et al. 2015; Hasan et al. 2021), ludzi (Neyroud et al. 2022), bawołów (Capra et al. 2022) oraz koni (Gabrys et al. 2022).

Obrazowanie konfokalne wykazało, że follikulosomy są początkowo pobierane przez komórki pęcherzykowe, a następnie przekazywane do oocyty. Obserwacje te są zgodne z wcześniej opublikowanymi doświadczeniami, w których zaobserwowano sygnały dla follikulosomów znakowanych fluorescencyjnie w komórkach pęcherzykowych oraz wewnątrz osłonki przejrzystej u bydła (da Silveira et al. 2017). Jednakże w niniejszym badaniu po raz pierwszy wykazano obecność FF-EVs wewnątrz połączeń trans-zonalnych. Do wizualizacji TZPs zastosowano barwienie falloidyną — cyklicznym heptapeptydem wiążącym się z filamentarną aktyną (F-aktyną), będącą składnikiem połączeń trans-zonalnych (Clarke, 2022). Na obrazach uzyskanych za pomocą mikroskopii konfokalnej przedstawiono sygnały dla follikulosomów

wykryte wewnątrz TZPs przechodzących przez osłonkę przejrzystą (Fig. 2A, 2B, Lipińska et al. 2025). Ponadto, zaobserwowano sygnały dla follikulosomów w pobliżu powierzchni oocyty, w obrębie miejsc łączenia TZPs z oocytem (Fig. 2C, Lipińska et al. 2025), które zostały opisane jako typowe przedłużenia połączeń trans-zonalnych w kierunku oocyty (Clarke, 2022). Sygnały FF-EVs zaobserwowano także w przestrzeni okołozótkowej (Fig. 2D, Lipińska et al. 2025) oraz w cytoplazmie oocyty (Fig. 2E, Lipińska et al. 2025). Uzyskane obrazy wskazują, że FF-EVs są pobierane z pożywki przez komórki pęcherzykowe, a następnie transportowane do wnętrza oocyty za pośrednictwem TZPs. Macaulay et al. (2014) wykazali wcześniej, że przez TZPs z komórek pęcherzykowych do wnętrza oocyty bydła mogą być transportowane długie cząsteczki RNA. W późniejszych badaniach powiązano ten mechanizm z procesem dojrzewania oocyty regulowanym przez sygnalizację cAMP (Macaulay et al. 2016). Aż do tego momentu nie zidentyfikowano jednak TZPs jako bezpośredniego szlaku transportu FF-EVs do wnętrza oocyty.

W niniejszej pracy wykazano również, że komórki pęcherzykowe wchodzące w skład kompleksów oocyt–cumulus wykazują istotnie większy pobór FF-EVs w warunkach indukowanego stresu metabolicznego w porównaniu do grupy kontrolnej. Zwiększony pobór obserwowano zarówno w warunkach inhibicji metabolizmu glukozy, jak i kwasów tłuszczowych. Wcześniejsze badania wykazały, że komórki uwalniają pęcherzyki zewnątrzkomórkowe w odpowiedzi na bodźce stresowe w celu rozprzestrzeniania cząsteczek sygnałowych lub usuwania materiału dla komórki zbędnego (Chiaradia et al. 2021). Ponadto zawartość pęcherzyków zewnątrzkomórkowych zmienia się w odpowiedzi na czynniki stresowe (np. stres oksydacyjny), co wpływa na zdolność komórek docelowych do przystosowania się do niekorzystnych warunków oraz utrzymania ich żywotności (Eldh et al. 2010). Zgodnie z aktualnym stanem wiedzy, w niniejszej pracy po raz pierwszy wykazano zwiększony pobór follikulosomów przez komórki pęcherzykowe w odpowiedzi na warunki stresu metabolicznego podczas dojrzewania *in vitro*, co sugeruje potencjalną rolę FF-EVs we wspieraniu mechanizmów przeciwdziałających niekorzystnym czynnikom środowiskowym.

5.2. Rola follikulosomów w metabolizmie COC

Wcześniejsze badania wykazały, że środowisko dojrzewania oocytów wpływa nie tylko na same oocyty, ale również na metabolizm komórek pęcherzykowych (Lipińska et al. 2021) oraz wywiera istotny wpływ na programowanie rozwoju zarodka przedimplantacyjnego na poziomie

komórkowym i molekularnym (Pawlak et al. 2024). W niniejszym badaniu, w warunkach kontrolnych, w których jedyną modyfikacją pożywki do dojrzewania COC była suplementacja follikulosomami (CON+ vs CON), odnotowano istotnie wyższy odsetek wylęgania blastocyst po dodatku FF-EVs. Brak różnic w pozostałych parametrach jakości może wynikać z optymalnych warunków, w których oocyty nie wymagają dodatkowego wsparcia ze strony follikulosomów w zakresie dojrzewania jądrowego czy pierwszych podziałów mitotycznych powstałych dalej zarodków, a także formowania blastocyst. Hipotezę tę dodatkowo potwierdzają wyniki analizy poboru follikulosomów przez komórki pęcherzykowe, gdzie nie zaobserwowano zwiększonego ich poboru w warunkach kontrolnych. Z kolei zaobserwowany wzrost odsetka wylęgania blastocyst jest biologicznie uzasadniony i zgodny z wcześniejszymi doniesieniami Pavani et al. (2022), którzy wykazali, że mikroRNA miR-378a-3p obecne w pęcherzykach zewnątrzkomórkowych może wspierać wylęganie blastocyst bydłęcych (Pavani et al. 2022). We wcześniejszych doniesieniach mikroRNA miR-378 było zaangażowane we wspieranie przeżywalności i rozwoju komórek trofoblastu u człowieka oraz regulację różnicowania trofoblastu i rozwój łożyska u myszy (Luo et al. 2012, Hayder et al. 2018).

W komórkach pęcherzykowych COC suplementowanych FF-EVs zaobserwowano istotny wzrost poziomu transkryptów genów *ACACA* oraz *GLUT1*, któremu towarzyszyły wyraźne zmiany w parametrach kropli lipidowych – odnotowano wyższą zawartość lipidów, zwiększoną liczbę kropli lipidowych oraz istotnie zmniejszony ich rozmiar. Podwyższona ekspresja genu *ACACA*, kodującego kluczowy enzym biosyntezy kwasów tłuszczowych (Lopez-Casillas et al. 1988), sugeruje intensyfikację lipogenezy *de novo*. Jednocześnie wzrost poziomu *GLUT1*, odpowiedzialnego za transport glukozy do wnętrza komórki wskazuje na zwiększony pobór tego cukru, który stanowi źródło zarówno energii (ATP), jak i prekursorów lipogenezy (acetylo-CoA). Tym samym obserwowane na poziomie molekularnym zmiany ekspresji genów znajdują odzwierciedlenie w zmianach fenotypowych – zwiększona biosynteza lipidów prawdopodobnie prowadzi do gromadzenia liczniejszych, ale mniejszych kropli lipidowych, co może świadczyć o ich większej dostępności jako źródła energii (Yu & Li, 2017). W oparciu o powyższe dane oraz wyniki pracy Hung et al. (2015), w której wykazano, że pęcherzyki zewnątrzkomórkowe wspierają ekspansję komórek pęcherzykowych podczas dojrzewania (Hung et al. 2015), sugerować można, że obserwowany wzrost metabolizmu lipidów oraz ich dostępności może stanowić mechanizm adaptacyjny mający na celu zwiększenie produkcji energii niezbędnej do procesu ekspansji tych komórek. Co ciekawe, w oocytach dojrzewających z dodatkiem EVs nie zaobserwowano zmian w parametrach kropli lipidowych, jednak

stwierdzono istotnie obniżony poziom transkryptów genów *GLUT1*, *ACACA* oraz *PLIN2*. Spadek ekspresji tych trzech genów biorących udział w metabolizmie lipidowym (*ACACA*, *GLUT1*) i stabilizacji kropli lipidowych (*PLIN2*), może wskazywać na brak potrzeby intensyfikacji metabolizmu lipidowego w oocyocie. Zasadne wydaje się kontynuowanie badań w tym kierunku, celem pełniejszego zrozumienia mechanizmów regulujących metabolizm lipidów w oocyocie.

5.3. Rola follikulosomów w odpowiedzi COC na warunku stresu metabolicznego

Wcześniejsze wyniki doświadczeń z wykorzystaniem inhibitorów metabolizmu glukozy i kwasów tłuszczowych podczas dojrzewania kompleksów oocyt–cumulus była *in vitro* wskazują na istotne zmiany zarówno w obrębie oocytu, komórek pęcherzykowych jak i blastocyst. Obserwowano zmiany w parametrach kropli lipidowych oraz poziomach mRNA w oocytach i komórkach pęcherzykowych w obu systemach inhibicji. Natomiast inhibicja metabolizmu glukozy w szczególności negatywnie wpłynęła na wskaźniki efektywności hodowli zarodków, co objawiło się obniżonym odsetkiem zarodków, które podjęły pierwszy podział mitotyczny, zmniejszonym odsetkiem tworzenia blastocyst oraz niższym odsetkiem wylegania blastocyst (Lipinska et al. 2021). Dodatkowo, oba systemy inhibicji miały znaczący wpływ na cechy jakościowe powstających blastocyst, prowadząc do zmniejszenia liczby blastomerów w trofektodermie oraz zaburzeń w szlakach metabolicznych odpowiedzialnych za jakość blastocysty (Pawlak et al. 2024). W związku z powyższym, celem niniejszych badań była ocena czy suplementacja follikulosomami może wspomóc dojrzewanie oocytów w warunkach niekorzystnych metabolicznie, zapewniając poprawę jakości zarodków.

Uzyskane w niniejszym doświadczeniu wyniki jednoznacznie wskazują, że suplementacja follikulosomami podczas IVM w warunkach stresu metabolicznego wpływa istotnie na jakość oocytów dojrzewających w warunkach zaburzeń metabolizmu energetycznego. Skutkuje to wyraźnie wyższym odsetkiem oocytów osiągających stadium MII, zarówno podczas indukowanych zaburzeń metabolizmu glukozy jak i kwasów tłuszczowych. Sugeruje się, że bio-ładunek przenoszony przez pęcherzyki zewnątrzkomórkowe może wspomagać dojrzewanie jądrowe oocytów. Hipotezę tę wspierają wyniki badań Fiorentino et al. (2024), którzy w modelu myszy wykazali, że EVs pochodzące z komórek pęcherzykowych wydzielanych podczas dojrzewania (od stadium GV do MII) zawierały m.in. miRNA regulujące ekspresję 71 genów, z czego 24 geny były zaangażowane w kluczowe procesy

niezbędne do wznowienia podziału mejotycznego oocyta (aktywacja MPF, kontrola tworzenia wrzeciona podziałowego, cytokineza) (Fiorentino et al. 2024). Ponadto, analiza proteomiczna FF-EVs pochodzących z płynu pęcherzykowego kota domowego wykazała obecność 674 grup białek zaangażowanych w regulację licznych szlaków biologicznych biorących udział m.in. w regulacji wzrostu pęcherzyka, metabolizmie energetycznym oocyta, dojrzewaniu oocyta, odpowiedzi na stres oraz komunikacji międzykomórkowej (Ferraz et al. 2020). Na podstawie tych danych można przypuszczać, że zaobserwowany w niniejszym badaniu zwiększony pobór follikulosomów w odpowiedzi na warunki stresu metabolicznego, może wspierać prawidłowy przebieg mejozy oraz sprzyjać poprawie jakości kompleksów COC, poprzez modulację ścieżek sygnałowych.

W komórkach pęcherzykowych COC podlegających dojrzewaniu w niekorzystnych warunkach stresu metabolicznego, zmiany w poziomie mRNA genów związanych z metabolizmem energetycznym oraz w parametrach kropli lipidowych po suplementacji follikulosomami były bardziej wyraźne niż w oocytach. Największe zmiany zaobserwowano w warunkach inhibicji metabolizmu glukozy – suplementacja FF-EVs prowadziła do obniżenia poziomów transkryptów genów *ACACA* i *PPARA*. Dodatkowo zaobserwowano zmniejszoną zawartość lipidów, co sugeruje, że suplementacja follikulosomami może wspierać wykorzystanie kropli lipidowych jako źródła energii w warunkach ograniczonej glikolizy. Ponadto, obniżona ekspresja genu *PPARA* po suplementacji FF-EVs sugeruje redukcję poboru kwasów tłuszczowych, co również może ograniczać akumulację rezerw energetycznych w postaci kropli lipidowych. Uzyskane wyniki sugerują, że suplementacja FF-EVs wspiera pozyskiwanie energii z lipidów w warunkach zaburzeń metabolizmu glukozy w komórkach pęcherzykowych. W przypadku oocytów odnotowano pojedyncze zależności pomiędzy parametrami kropli lipidowych grup suplementowanych do niesuplementowanych (zmniejszony poziom zawartości lipidów dla grupy z inhibicją metabolizmu glukozy oraz mniejszy rozmiar kropli lipidowych dla grupy z inhibicją metabolizmu lipidów). Co ciekawe, w analizie poziomu mRNA, większość z badanych genów wykazywała obniżoną ekspresję w co najmniej jednej z grup suplementowanych FF-EVs, jednak nie zaobserwowano jednoznacznego wzorca odpowiedzi. Wyniki te wskazują na złożoność procesów zaangażowanych w metabolizm kompleksów oocyt-cumulus i sugerują potrzebę dalszych badań w celu pełniejszego zrozumienia roli pęcherzyków zewnątrzkomórkowych w tym procesie.

W badaniach Benedetti et al. (2024) wykazano, że suplementacja pożywki do dojrzewania *in vitro* wybranymi mikroRNA, zidentyfikowanymi w follikulosomach, istotnie poprawia jakość

uzyskiwanych następnie blastocyst, zwiększając zarówno całkowitą liczbę komórek, jak i liczbę komórek w węźle zarodkowym. W niniejszym badaniu potwierdzono, że suplementacja FF-EVs podczas dojrzewania *in vitro* wywiera korzystny wpływ zarówno na wskaźniki rozwoju zarodkowego, jak i jakość powstałych zarodków. Odsetek blastocyst był istotnie wyższy w grupie IODH+, natomiast odsetek wylęgania blastocyst zwiększył się we wszystkich grupach suplementowanych w porównaniu do ich niesuplementowanych odpowiedników (Fig. 3, Lipińska et al. 2025). W świetle wcześniejszych doniesień, wskazujących, że inhibicja metabolizmu glukozy i kwasów tłuszczowych indukuje odpowiedź stresową prowadzącą do pogorszenia jakości zarodków przedimplantacyjnych (Pawlak et al. 2024), uzyskane wyniki sugerują, że suplementacja FF-EVs nie tylko wspomaga proces dojrzewania oocytów, lecz także zwiększa ich kompetencję rozwojową oraz jakość powstałych zarodków.

Powyższe wnioski na temat korzystnego wpływu suplementacji FF-EVs podczas IVM na jakość zarodków znajdują dodatkowe potwierdzenie w wynikach analizy lipidomicznej. Pierwszym jej etapem było zastosowanie analizy wzbogacenia szlaków metabolicznych. Jest to wtórna analiza danych omicznych, dzięki której można wykryć które procesy biologiczne są statystycznie nadreprezentowane, a tym samym potencjalnie istotne w analizowanym zjawisku (Tipney & Hunter, 2010). Analiza wzbogacenia szlaków metabolicznych wykazała, że suplementacja FF-EVs aktywuje te same dwa szlaki metaboliczne dla obu systemów inhibicji metabolizmu energetycznego: biosyntezę fosfolipidów oraz metabolizm kwasu arachidonowego. Szlaki te są kluczowe dla struktury i funkcjonowania błon komórkowych (Slotte, 2013; Wang et al. 2019; Morita & Ikeda, 2022). Ponadto, uczestniczą w wielu procesach biologicznych, takich jak obrona komórkowa, naprawa oraz odpowiedź zapalna (za pośrednictwem kwasu arachidonowego) (Nihad et al. 2023). Wcześniejsze obserwacje blastocyst pochodzących z oocytów dojrzewających w warunkach zaburzonego metabolizmu glukozy i kwasów tłuszczowych wykazały mniejszą liczbę blastomerów w trofektodermie (Pawlak et al. 2024). Natomiast w świetle niniejszych wyników można przypuszczać, że pobrane podczas IVM follikulosomy wspierają dalszą proliferację blastocyst, stymulując podziały komórkowe. Poprzez modulację szlaku metabolizmu kwasu arachidonowego, follikulosomy mogą również wspierać implantację w dalszym rozwoju zarodka. Hipotezę tę potwierdza zaobserwowany wzrost odsetka wylęgania blastocyst we wszystkich grupach suplementowanych FF-EVs.

Kolejną analizą lipidomiczną była analiza krotności zmian (fold-change), która służy do porównania poziomów metabolitów pomiędzy warunkami eksperymentalnymi a kontrolnymi.

Wykazano, że dla blastocyst IODH⁺ acylokarnityny stanowiły najliczniejszą klasę lipidów, przy czym ich poziom był istotnie obniżony w stosunku do kontroli. Acylokarnityny odgrywają kluczową rolę regulacyjną w utrzymaniu równowagi pomiędzy akumulacją lipidów a metabolizmem węglowodanów i lipidów wewnątrzkomórkowych, ponieważ umożliwiają transport aktywowanych długłańcuchowych kwasów tłuszczowych do mitochondriów na potrzeby β -oksydacji (Wang et al. 2024). Pełnią również funkcję antyoksydacyjną, neutralizując reaktywne formy tlenu w komórkach. Jednak podwyższony poziom acylokarnityn może prowadzić do uszkodzenia mitochondriów i zaburzeń ich funkcjonowania (Xiang et al., 2025). Zatem zaobserwowany w niniejszym badaniu obniżony poziom acylokarnityn w komórkach blastocysty może wskazywać na zmniejszony udział β -oksydacji w metabolizmie zarodka. Co więcej, może to pośrednio świadczyć o prawidłowym funkcjonowaniu mitochondriów i niższym poziomie stresu oksydacyjnego. Biorąc pod uwagę, że blastocysty IODH⁺ cechowały się wysokim odsetkiem wylęgania, a obecność reaktywnych form tlenu negatywnie wpływa na rozwój i jakość zarodka (Ali et al. 2017), wnioski te wydają się uzasadnione – choć wymagają dalszej weryfikacji. W odpowiedzi na inhibicję metabolizmu lipidów podczas IVM z jednoczesnym dodatkiem follikulosomów, w blastocystach ETO⁺ zidentyfikowano dwie podklasy lipidów, których poziom był istotnie podwyższony w stosunku do grupy ETO: fosfatydylocholina i fosfatydyloetanolamina. Fosfolipidy te należą do najważniejszych składników błon komórkowych ssaków i pełnią kluczowe funkcje jako elementy strukturalne, uczestnicy szlaków metabolicznych i sygnałowych, elementy transportu błonowego i autofagii, a także mediatory interakcji białkowych (Van der Veen et al. 2017; Calzada et al. 2016). Wzbogacenie lipidomu o te frakcje może wspierać utrzymanie prawidłowego składu lipidowego błon komórkowych, co ma znaczenie dla ich dynamiki, przekazywania sygnałów oraz funkcji metabolicznych. Co więcej, zwiększone poziomy fosfatydylocholiny i fosfatydyloetanolaminy mogą poprawiać zdolność komórek do radzenia sobie w warunkach stresu poprzez zwiększoną autofagię, co z kolei może prowadzić do zwiększonego przeżycia i funkcjonalności komórek. Wyniki te wskazują, że suplementacja follikulosomami podczas dojrzewania *in vitro* skutkuje powstawaniem blastocyst lepiej przystosowanych do radzenia sobie ze stresem metabolicznym i zdolnych do bardziej efektywnych podziałów komórkowych. Wnioski te znajdują potwierdzenie w wyższym odsetku wylęgania blastocyst ETO⁺ uzyskanych w tym badaniu.

5.4. Charakterystyka kropli lipidowych podczas rozwoju przedimplantacyjnego zarodków bydła

We współczesnych badaniach, oprócz licznych doniesień dotyczących znaczenia metabolizmu energetycznego podczas wzrostu i dojrzewania oocytów, coraz większą uwagę poświęca się również charakterystyce metabolizmu energetycznego w rozwijających się zarodkach, ze szczególnym uwzględnieniem roli metabolizmu lipidowego. Lipidy są niezbędnymi składnikami komórek, ponieważ biorą udział w tworzeniu błon komórkowych oraz w kluczowych procesach, takich jak podziały komórkowe, różnicowanie czy kaskady sygnalizacyjne. Brak równowagi w zawartości lipidów może negatywnie wpływać nie tylko na sam metabolizm lipidów, ale także na homeostazę komórkową, co może prowadzić do obniżonej jakości zarodków (Ibayashi et al. 2021). W eksperymencie nr 2 oceniano kilka parametrów lipidowych (zawartość lipidów, liczbę kropli lipidowych, rozmiar kropli lipidowych oraz procentową powierzchnię zajmowaną przez krople lipidowe) i porównano je między kolejnymi etapami rozwoju bydlęcych zarodków przedimplantacyjnych pozyskiwanych *in vitro*.

Najniższe wartości wszystkich analizowanych parametrów kropli lipidowych zaobserwowano w stadium 8–16-komórkowym zarodków bydlęcych, co zbiega się w czasie z aktywacją genomu zarodkowego u bydła. Wcześniejsze badania sugerowały, że aktywacja genomu zarodkowego (ang. embryo genome activation, EGA) wymaga dużych nakładów energetycznych ze względu na intensywną transkrypcję genów (Zhai et al. 2022). Hipoteza ta jest poparta wynikami transkryptomicznymi Milazzotto et al. (2022), którzy wykazali wzrost ekspresji genów związanych z katabolizmem trójglicerydów w stadium 8-komórkowym w porównaniu do wcześniejszych etapów. Obserwacje w ramach omawianej analizy, dotyczące zawartości lipidów w kroplach lipidowych mogą zatem sugerować, że podczas EGA intensywnie zachodzi katabolizm trójglicerydów, co prowadzi do spadku zawartości lipidów, aby wygenerować dużą ilość energii. Sudano et al. (2016) nie zaobserwowali spadku zawartości lipidów na etapie 8–16-komórkowym, co zostało wykazane barwieniem kropli lipidowych barwnikiem Nile Red. Należy jednak podkreślić, że cytowane wyniki zostały uzyskane przy użyciu prostego mikroskopu fluorescencyjnego, a każdy zarodek był analizowany jedynie w płaszczyźnie równikowej (Sudano et al. 2016). W niniejszym eksperymencie zastosowano mikroskop konfokalny, co pozwoliło na uzyskanie większej precyzji dzięki rekonstrukcji 3D zarodka.

Drugim interesującym wynikiem analizy bydlęcych zarodków IVF był znaczący wzrost liczby kropli lipidowych w stadium ekspandującej blastocysty, co sugeruje zwiększone zapotrzebowanie na zabezpieczenie źródła energii na tym etapie rozwoju. Zgadza się to z wynikami Milazzotto et al. (2022), którzy wykazali wzrost ekspresji genów związanych zarówno z metabolizmem węglowodanów, jak i lipidów w blastocystach, w tym biosyntezy trójglicerydów. Co więcej, geny związane z glikolizą nie wykazywały istotnych zmian w blastocystach (Milazzotto et al. 2022). Jest to o tyle zaskakujące, że wcześniej sugerowano, iż na tym etapie rozwoju zarodkowego preferowane jest pozyskiwanie energii z węglowodanów (Leese, 2012). Jednakże, wysoka zawartość kropli lipidowych może wynikać z faktu, że na etapie blastocysty zachodzą intensywne podziały mitotyczne, które wymagają tworzenia błon dla nowych komórek. Wskazuje się, że lipidy magazynowane w kroplach lipidowych mogą zostać zmobilizowane do syntezy fosfolipidów w sytuacji zwiększonego zapotrzebowania na budowę błon komórkowych (Olzmann & Carvalho, 2019). Ponadto, formowanie ICM/TE, tworzenie blastocelu oraz dalsza implantacja są procesami wymagającymi dużych nakładów energetycznych (Ibayash et al. 2021), dlatego zarodki intensywnie magazynują krople lipidowe na potrzeby dalszego prawidłowego rozwoju. Hipoteza ta została ostatnio potwierdzona przez badania Mau et al. (2022), którzy wykazali, że akumulacja kropli lipidowych w okolicach implantacji zarodków myszy jest konieczna dla prawidłowego rozwoju przedimplantacyjnego.

5.5. Wpływ obecności/braku materiału genetycznego ojcowskiego na charakterystykę kropli lipidowych zarodków przedimplantacyjnych

Oocyty mogą zostać skutecznie aktywowane bez udziału męskiego gamety poprzez indukcję ich do wielokrotnych podziałów, co inicjuje rozwój zarodkowy w procesie partenogenezy. Obserwowane jest, jednakże późniejsze zatrzymanie rozwoju zarodków aktywowanych partenogenetycznie na etapie blastocysty, co wynika ze zmian w ich imprintingu genomowym (Hao et al. 2004, Kirioukhova et al. 2018). Partenogenetyczna aktywacja oocytów stała się uznaną strategią badawczą służącą do porównawczej analizy roli genomu ojcowskiego i matczynego w regulacji wczesnych etapów rozwoju zarodka. Co więcej, aktywacja partenogenetyczna ma istotne znaczenie w badaniach nad klonowaniem, ponieważ sztuczna aktywacja oocytów stanowi kluczowy element protokołów transferu jądrowego (Singh et al. 2019).

Aby określić wpływ aktywacji partenogenetycznej (a pośrednio – wpływ obecności ojcowskiego materiału genetycznego) na parametry kropli lipidowych w zarodkach przedimplantacyjnych, porównano bydłące zarodki partenogenetyczne (b.PA) z ich odpowiednikami uzyskanymi metodą zapłodnienia *in vitro* (b.IVF). Dokonano trzech głównych obserwacji: 1) zygoty b.PA zawierają istotnie mniej lipidów ($p < 0,01$) niż zygoty b.IVF; 2) zarodki b.PA w stadium 8–16-komórkowym wykazują istotnie wyższe wartości we wszystkich analizowanych parametrach niż b.IVF ($p < 0,01$); 3) ekspandujące blastocysty b.PA zawierają znacznie więcej lipidów oraz większe krople lipidowe w porównaniu do b.IVF.

Podczas standardowego zapłodnienia plemnik indukuje degradację aktywności kinazy białkowej hamującej podział mejotyczny poprzez powtarzające się wzrosty poziomu jonów wapnia (Miao & Williams, 2012). W protokołach PA mechanizm ten jest indukowany chemicznie lub fizycznie. W niniejszej pracy sugeruje się, że zygoty poddane aktywacji partenogenetycznej mogą wykazywać wyższe zużycie energii w odpowiedzi na chemicznie (za pomocą jonomycyny) wywołane procesy analogiczne do tych obserwowanych podczas zapłodnienia. Odwrotna sytuacja została zaobserwowana w stadium 8–16-komórkowym, gdzie w grupie b.IVF stwierdzono znacznie niższe wartości wszystkich parametrów lipidowych w porównaniu do b.PA. Ponieważ jest to moment aktywacji genomu zarodkowego u bydła, możliwe są dwie wyjaśnienia. Pierwsze zakłada, że zarodki b.IVF, zawierające zarówno materiał genetyczny matczyny, jak i ojcowski, przechodzą proces demetylacji obu genomów, co wymaga większego nakładu energetycznego niż w przypadku zarodków partenogenetycznych, które składają się jedynie z podwojonego, epigenetycznie imprintowanego genomu matczynego. Druga hipoteza sugeruje, że zarodki b.PA mogą mieć zaburzoną ekspresję genów kontrolujących metabolizm lipidów, szczególnie tych związanych z lipolizą (czyli procesem hydrolizy trójglicerydów), ze względu na obecność wyłącznie matczynego wzoru metylacji. Ze względu na brak innych publikacji skupiających się na tym temacie, jest to niezwykle interesujący obszar do dalszych badań.

W niniejszym eksperymencie zaobserwowano również znacząco większą akumulację lipidów w blastocystach b.PA w porównaniu do blastocyst b.IVF. Badania na innych gatunkach wykazały, że aktywacja partenogenetyczna nie wpływa na metabolizm glukozy w blastocystach kóz (Ongeri & Krisher, 2001), natomiast zaburza metabolizm lipidów (Pu et al. 2020). W omawianej pracy również zaobserwowano wyższą zawartość lipidów w blastocystach PA. Wszystkie te obserwacje mogą wynikać z zaburzonej regulacji procesów lipolizy w zarodkach partenogenetycznych, co jednak pozostaje jedynie hipotezą.

5.6. Różnice międzygatunkowe w charakterystyce kropli lipidowych zarodków przedimplantacyjnych

Porównano również zarodki bydła i świni na różnych etapach rozwoju przedimplantacyjnego. Pierwszą zauważoną obserwacją był brak różnic w zawartości lipidów między zygotami obu gatunków. Jest to dość zaskakujące, ponieważ oocyty świni mają znacznie wyższą zawartość lipidów niż oocyty innych gatunków zwierząt gospodarskich. Wcześniejsze badania wykazały, że liczba i morfologia kropli lipidowych różnią się pomiędzy zarodkami świni rozwijającymi się *in vivo*, *in vitro* oraz partenogenetycznie (Kikuchi et al. 2002). Można zatem zasugerować, że zygoty świni intensywniej wykorzystują lipidy niż zygoty bydlęce, co skutkuje wyrównaną zawartością lipidów na tym etapie rozwoju. Następnie zaobserwowano niższą zawartość lipidów w zarodkach p.PA w porównaniu do zarodków b.PA na etapach od 2-komórkowego do stadium moruli. Jednakże na tym samym etapie rozwoju zarodki świni charakteryzowały się większym rozmiarem kropli lipidowych oraz większą powierzchnią zajmowaną przez krople lipidowe. Zatem wyniki mogą wskazywać na zmienne indywidualne cechy kropli lipidowych u tych dwóch gatunków, których pochodzenie jest trudne do wyjaśnienia na podstawie niniejszego eksperymentu. Odwrotne wyniki zaobserwowano w wczesnych i ekspandujących blastocystach, gdzie wyższe parametry lipidowe występowały w zarodkach świni, co jest zgodne z wynikami Kajdasz et al. (2020), który wykazał istotnie wyższą liczbę kropli lipidowych w blastocystach świni w porównaniu do bydła (Kajdasz et al. 2020). Ponadto, wyniki RNA-seq tych autorów wykazały wzrost ekspresji genów związanych z metabolizmem glukozy jako preferowanego źródła energii dla blastocyst PA świni, w przeciwieństwie do blastocyst bydlęcych (Kajdasz et al. 2020). Sugeruje to, że blastocysty partenogenetyczne świni, podobnie jak bydlęce, częściowo przechodzą na metabolizm glukozy, jednak wciąż silnie magazynują lipidy bez ich nadmiernego wykorzystywania. Rola tego procesu pozostaje jednak nieznana.

Innym ciekawym wynikiem niniejszego doświadczenia było porównanie międzygatunkowe rozmiaru i liczby kropli lipidowych. Krople lipidowe w zarodkach świni są większe, ale mniej liczne w porównaniu do zarodków bydlęcych, co obserwuje się we wszystkich stadiach rozwojowych zarodka. Sugeruje się, że jest to cecha specyficzna dla gatunku, ponieważ podobne obserwacje dotyczące wielkości kropli lipidowych odnotowano również w oocytach bydlęcych (Lipińska et al. 2021, Warzych et al. 2024), gdzie osiągały one średnicę około 4 μm , natomiast w zarodkach świni były one trzykrotnie większe (Lee et al. 2019).

5.7. Blastocysta – parametry lipidowe i markery jakościowe

Liczba blastomerów w blastocystie jest powszechnie uznawana za jeden z istotnych markerów jakości zarodka. W niniejszej pracy określono całkowitą liczbę komórek dla trzech stadiów rozwojowych: moruli, wczesnej blastocysty oraz blastocysty ekspandującej. Porównanie liczby blastomerów pomiędzy zarodkami b.IVF a b.PA wykazało, że morule oraz ekspandujące blastocysty uzyskane metodą zapłodnienia *in vitro* zawierały istotnie więcej komórek niż odpowiadające im stadia partenogenetyczne, odpowiednio: 24 ± 3 vs 19 ± 2 dla moruli oraz 118 ± 19 vs 67 ± 14 dla ekspandujących blastocyst. Dla wczesnych blastocyst nie odnotowano istotnych różnic. W literaturze wskazuje się, że wyższa liczba komórek w blastocystie może stanowić wskaźnik lepszej jakości zarodka (Van Soom et al. 1997). Zgodnie z doniesieniami Mori et al. (2002), zarówno liczba komórek, jak i średnica blastocysty są powiązane ze stadium jej rozwoju, a w przypadku ekspandujących blastocyst wykazano dodatnią korelację pomiędzy liczbą komórek, a średnicą zarodka. W badaniu tym podano również, że liczba komórek w ekspandującej blastocystie bydła mieści się w zakresie 80–119 (Mori et al. 2002). Zatem uzyskane wyniki sugerują niższy potencjał rozwojowy zarodków partenogenetycznych, co jest zgodne z dotychczasową wiedzą na temat ich ograniczonej zdolności do dalszego rozwoju *in vivo*. Co zaskakujące, wyniki uzyskane dla partenogenetycznych blastocyst świni wykazały, że zarówno wczesne blastocysty, jak i te ekspandujące zawierały średnią liczbę blastomerów zgodną z danymi literaturowymi dotyczącymi typowej liczby komórek w blastocystach świń uznawanych za dobrej jakości. Zarodki te, zbierane w dniach 5. i 6. rozwoju, zwykle zawierają od 30 do 45 komórek (Yuan et al. 2017; Yoshioka et al. 2019). Warto jednak podkreślić, że wszystkie dostępne dane literaturowe dotyczą zarodków uzyskanych metodą zapłodnienia *in vitro*, natomiast brakuje danych opisujących zarodki partenogenetyczne.

Podczas rozwoju zarodka przedimplantacyjnego, początki różnicowania komórek obserwowane są już na etapie moruli i kontynuowane są na etapie blastocysty, kiedy formują się komórki wężła zarodkowego oraz trofektodermi (Piliszek & Madeja, 2018). Ponieważ obie linie komórkowe pełnią różne funkcje, ich zapotrzebowanie na energię również jest odmienne. Komórki TE zużywają więcej pirogronianu i mniej glukozy, natomiast w ICM obserwuje się odwrotny efekt (Gopichandran & Leese, 2003). W trofektodermie przeżuwaczy obserwuje się wyraźnie podwyższony poziom transkrypcji genów związanych z wychwytem, metabolizmem oraz biosyntezą *de novo* kwasów tłuszczowych i prostaglandyn, co w dużej mierze wiąże się z aktywacją receptora PPAR γ , który poprzez wiązanie ligandów lipidowych koordynuje metabolizm energetyczny (Ye et al. 2021). Jednak metabolizm lipidów w komórkach wężła

zarodkowego oraz trofektodermie pozostaje nadal słabo poznany. Świadomi różnic w metabolizmie węglowodanów, zdecydowano się na przeanalizowanie zawartości lipidów w ICM w odniesieniu do całej blastocysty. We wszystkich analizowanych przypadkach (b.IVF, b.PA, p.PA) zaobserwowano ten sam schemat – w ICM znajdowała się połowa zawartości lipidów całej blastocysty (51% b.IVF, 52% b.PA i 42% p.PA). Jednakże wiadomo, że całkowita powierzchnia komórek nie jest równomiernie podzielona między te dwie linie, ponieważ ICM to tylko ok. 30% wszystkich komórek blastocysty (Gopichandran & Leese, 2003). Sugeruje się, że komórki ICM intensywniej magazynują lipidy ze względu na swoją pluripotencję, czyli zdolność do różnicowania się w dowolny typ komórek somatycznych. Badania prowadzone na ludzkich pluripotencjalnych komórkach macierzystych wykazały, że kwasy tłuszczowe są kluczowymi metabolitami wspierającymi ich proliferację, pełniąc funkcję zarówno składników błon komórkowych, jak i źródła energii (Diamante & Martello, 2022). Wykazano również wysoką ekspresję syntazy kwasów tłuszczowych (*FASN*) w tych komórkach, a jej inhibicja prowadziła do śmierci komórkowej na drodze apoptozy zależnej od mitochondriów. Na tej podstawie autorzy wysunuli wniosek, że synteza *de novo* kwasów tłuszczowych odgrywa istotną rolę w przeżywalności ludzkich pluripotencjalnych komórek macierzystych (Tanosaki et al, 2020). Brak różnic pomiędzy analizowanymi grupami (b.IVF vs. b.PA oraz b.PA vs. p.PA) można wyjaśnić tożsamym mechanizmem molekularnym różnicowania komórek w obrębie blastocysty w ICM/TE. Zarówno w przypadku zarodków bydła jak i świni, dwa te same geny – *CDX2* oraz *OCT-4*, są opisywane jako niezbędne dla rozwoju zarodka oraz wyodrębnienia linii komórkowych (Emura et al. 2016; Sakurai et al. 2016, Bou et al. 2017). Pozostaje to jednak jedynie hipotezą, która wymaga dalszych badań.

Dodatkowo przeprowadzono analizę zawartości lipidów w przeliczeniu na pojedynczy blastomer. Porównanie wyników uzyskanych dla zarodków na trzech różnych etapach rozwoju (morula, wczesna blastocysta i ekspandująca blastocysta) w grupach b.IVF vs b.PA oraz b.PA vs p.PA wykazało, że obserwowane zależności były jednakowe z wynikami analizy lipidów w przeliczeniu na cały zarodek. Co istotne, analiza ta wykazała również, że pomimo najmniejszej liczby komórek w blastocystach PA świń (wśród 3 analizowanych grup), zarodki te charakteryzowały się najwyższą zawartością lipidów. Biorąc pod uwagę, że blastocysty świń charakteryzują się bardzo wysoką zawartością lipidów (Bradley & Swann, 2019), oraz opisywane powyżej różnice gatunkowo specyficzne dla liczby komórek w blastocystie (Yuen et al. 2017, Mori et al. 2002), uzyskane przez nas wyniki wydają się biologicznie uzasadnione.

6. Podsumowanie dyskusji i wnioski

Słowa poety Johna Donne'a „Nikt nie jest samotną wyspą”, choć często przywoływane w kontekście społecznym jako przypomnienie, że każdy człowiek funkcjonuje w relacji z innymi i jest częścią większej całości, dobrze oddają również istotę funkcjonowania oocytu w kontekście pęcherzyka jajnikowego. Oocyt nie dojrzewa w oderwaniu od otoczenia - jego rozwój jest wynikiem złożonych interakcji z komórkami pęcherzykowymi oraz czynnikami obecnymi w mikrośrodku pęcherzykowym. Hormony, metabolity, lipidy, reaktywne formy tlenu, sygnały międzykomórkowe i metabolizm energetyczny - wszystkie te elementy wpływają na jakość i kompetencję rozwojową oocytu. Zakłócenie któregośkolwiek z tych elementów może obniżyć potencjał oocytu i negatywnie rzutować na dalszy rozwój zarodka.

Postawiona w niniejszej pracy hipoteza, zakładająca istotną rolę środowiska pęcherzykowego - w szczególności follikulosomów oraz metabolizmu energetycznego - w procesie dojrzewania oocytów, a także znaczenie metabolizmu energetycznego jako potencjalnego markera jakości zarodków, została potwierdzona wynikami przeprowadzonych badań. W ramach rozprawy po raz pierwszy wykazano, że follikulosomy mogą pełnić funkcję kompensacyjną względem kompleksów oocyt-cumulus dojrzewających w warunkach zaburzonego metabolizmu glukozy lub kwasów tłuszczowych. Ich działanie przejawia się zarówno poprzez wyższe wskaźniki jakości hodowli, ale również obserwowane jest na poziomie mRNA i parametrów kropli lipidowych COC oraz lipidomiki powstałych blastocyst. Ponadto zidentyfikowano drogę transportu follikulosomów z pożywki do wnętrza oocytu, która jest realizowana przez połączenia trans-zonalne. Opisano charakterystyczne wzorce parametrów kropli lipidowych na kolejnych etapach rozwoju zarodka przedimplantacyjnego - od zygoty do ekspandującej blastocysty. Wskazują one różne zapotrzebowanie na lipidy w poszczególnych stadiach, wśród których największe zużycie zaobserwowano w zarodkach 8-16 komórkowych, podczas aktywacji genomu zarodkowego bydła. Wykazano istotne różnice zarówno gatunkowo-specyficzne (między zarodkami bydła a świni), obejmujące m.in. wielkość i liczbę kropli lipidowych, jak i różnice zależne od pochodzenia genomowego. Te ostatnie dotyczyły porównania zarodków bydlęcych pochodzenia *in vitro* oraz zarodków partenogenetycznych, w których zaobserwowano odmienne zużycie lipidów w kluczowych stadiach rozwojowych - takich jak etap 8-16 komórek oraz stadium blastocysty. Wyniki te mogą mieć znaczenie w dalszej ocenie kompetencji rozwojowej zarodków.

Podsumowując szczegółowo badania nad wybranymi aspektami metabolizmu energetycznego oocytów i przedimplantacyjnych zarodków bydlęcych w ramach niniejszej pracy, wykazano, że:

w eksperymencie nr 1:

1. Droga transportu follikulosomów do wnętrza oocytu realizowana jest poprzez połączenia trans-zonalne.
2. Komórki pęcherzykowe wykazują większy pobór follikulosomów w warunkach zaburzonego metabolizmu energetycznego.
3. Suplementacja pożywki do dojrzewania *in vitro* follikulosomami w warunkach zaburzonego metabolizmu energetycznego powoduje zmiany w parametrach kropli lipidowych oraz poziomie transkryptów genów zarówno w oocytach, jak i komórkach pęcherzykowych. Podkreślić należy jednak, że zmiany te są wyraźniej zaznaczone w komórkach pęcherzykowych.
4. Suplementacja pożywki do dojrzewania *in vitro* follikulosomami w warunkach zaburzonego metabolizmu energetycznego poprawia wskaźniki jakości hodowli (odsetek oocytów w stadium MII, odsetek tworzenia blastocyst i wylęgłych blastocyst) oraz wprowadza korzystne zmiany w jakości blastocyst wyrażonej profilem lipidomicznym.
5. Suplementacja pożywki do dojrzewania *in vitro* follikulosomami zwiększa istotnie odsetek wylęgłych blastocyst.

w eksperymencie nr 2:

6. Parametry kropli lipidowych ulegają zmianie w trakcie rozwoju zarodkowego, a najbardziej istotny spadek ich wartości zaobserwowano w stadium 8-16 komórkowym zarodków bydlęcych pozyskanych metodą IVF.
7. Parametry lipidowe w zarodkach bydlęcych po zapłodnieniu *in vitro* w porównaniu do aktywacji partenogenetycznej różnią się w najważniejszych momentach rozwoju zarodkowego - zygota, stadium 8–16 komórek, blastocysta.

8. Porównanie międzygatunkowe (bydło vs świnia) uwidocznilo gatunkowo-specyficzne cechy parametrów kropli lipidowych oraz różnice w wymaganiach energetycznych w odpowiadających sobie stadiach rozwoju zarodka.
9. Połowa lipidów wewnątrzkomórkowych blastocysty każdej z analizowanych grup była zlokalizowana w obrębie węzła zarodkowego.
10. Liczba blastomerów w morulach i ekspandujących blastocystach bydlęcych różni się między systemami IVF i PA

Na podstawie wyników uzyskanych w badaniach, sformułowano poniższe wnioski:

1. Follikulosomy są transportowane z pożywki hodowlanej do komórek pęcherzykowych, a następnie przekazywane do oocyty przez połączenia trans-zonalne, co wskazuje na ich znaczącą rolę w dojrzewaniu oocytów
2. Suplementacja follikulosomami podczas IVM w warunkach stresu metabolicznego wywiera korzystny wpływ na kompleksy oocyt-cumulus i blastocysty, co sugeruje ich rolę w przeciwdziałaniu negatywnym skutkom stresu
3. Parametry kropli lipidowych zmieniają się istotnie w trakcie kolejnych etapów rozwoju przedimplantacyjnego, co sugeruje zmiennie zapotrzebowania energetyczne w różnych stadiach rozwojowych
4. W porównaniu do całkowitej zawartości lipidów w blastocystach, podział między ICM i TE jest stosunkowo równy we wszystkich badanych grupach, pomimo wykazanej w literaturze różnej proporcji w liczbie komórek. Oznacza to duże zapotrzebowanie na lipidy w pluripotencjalnych komórkach ICM, gdzie lipidy mogą służyć zarówno za budulec błon komórkowych, jak i wysoko efektywne źródło energii.

Uzyskane w niniejszej pracy wyniki mogą stanowić podstawę do przyszłego opracowania optymalnych pożywek do dojrzewania oocytów *in vitro*, szczególnie w przypadku samic lub kobiet z zaburzeniami metabolizmu energetycznego. Kierunkiem przyszłych badań powinno być zidentyfikowanie konkretnych bio-elementów wewnątrz follikulosomów, które wspierają

kompetencję oocytów i zarodków, a także tych, które mogą świadczyć o ich obniżonej jakości. Poszukiwanie takich markerów może znacząco poprawić skuteczność selekcji komórek i zarodków przydatnych do rozrodu. Wskazano również potencjalną rolę lipidów jako markerów jakości zarodków, co może znaleźć zastosowanie w ocenie ich potencjału rozwojowego. Interesujące wydaje się poszerzenie badań nad parametrami lipidowymi w zarodkach o pełne analizy lipidomiczne w każdym stadium rozwoju, wskazujące potencjalne różnice w konkretnych lipidach. Rozwinięcie tych badań przyczyni się nie tylko do pogłębienia wiedzy w zakresie biologii rozrodu zwierząt, ale również może mieć znaczenie dla embriologii człowieka i rozwijającej się medycyny spersonalizowanej.

Bibliografia

- Ali, I., Shah, A., Jin, Y., Li, Z.-S., Ullah, O., & Fang, N.-Z. (2017). Reactive oxygen species-mediated unfolded protein response pathways in preimplantation embryos. *Journal of Veterinary Science*, 18(1), 1–1. <https://doi.org/10.4142/jvs.2017.18.1.1>
- Andrade, G. M., Collado, M. del, Flávio Vieira Meirelles, Juliano, & Perecin, F. (2019). Intrafollicular barriers and cellular interactions during ovarian follicle development. *Animal Reproduction*, 16(3), 485–496. <https://doi.org/10.21451/1984-3143-ar2019-0051>
- Anise Asaadi, Nima Azari Dolatabad, Hadi Atashi, Raes, A., Damme, P. V., Hoelker, M., Hendrix, A., Pascottini, O. B., Soom, A. V., Mojtaba Kafi, & Pavani, K. C. (2021). Extracellular Vesicles from Follicular and Ampullary Fluid Isolated by Density Gradient Ultracentrifugation Improve Bovine Embryo Development and Quality. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(2), 578–578. <https://doi.org/10.3390/ijms22020578>
- Baena, V., & Terasaki, M. (2019). Three-dimensional organization of transzonal projections and other cytoplasmic extensions in the mouse ovarian follicle. *Scientific Reports*, 9(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-018-37766-2>
- Barbosa, A. D., & Siniosoglou, S. (2017). Function of lipid droplet-organelle interactions in lipid homeostasis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1864(9), 1459–1468. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2017.04.001>
- Benedetti, C., Pavani, K. C., Yannick Gansemans, Nima Azari-Dolatabad, Pascottini, O. B., Peelman, L., Six, R., Fan, Y., Guan, X., Koen Deserranno, Fernández-Montoro, A., Hamacher, J., Filip Van Nieuwerburgh, Fair, T., Hendrix, A., Smits, K., & Soom, A. V. (2024). From follicle to blastocyst: microRNA-34c from follicular fluid-derived extracellular vesicles modulates blastocyst quality. *Journal of Animal Science and*

- Biotechnology/Journal of Animal Science and Biotechnology*, 15(1).
<https://doi.org/10.1186/s40104-024-01059-8>
- Berg, J. M., Tymoczko, J. L., Gatto, G. J., & Stryer, L. (2019). *Biochemistry* (9th ed.). W.H. Freeman & Company, a Macmillan Education Imprint.
- Bewicke-Copley, F., Mulcahy, L. A., Jacobs, L. A., Samuel, P., Akbar, N., Pink, R. C., & Carter, D. R. F. (2017). Extracellular vesicles released following heat stress induce bystander effect in unstressed populations. *Journal of Extracellular Vesicles*, 6(1), 1340746. <https://doi.org/10.1080/20013078.2017.1340746>
- Bischoff, S., Tsai, S. Q., Hardison, N. E., Motsinger-Reif, A. A., Freking, B. A., Nonneman, D. J., Rohrer, G. A., & Piedrahita, J. A. (2009). *Characterization of Conserved and Nonconserved Imprinted Genes in Swine1*. 81(5), 906–920.
<https://doi.org/10.1095/biolreprod.109.078139>
- Borges, F. T., Reis, L. A., & Schor, N. (2013). Extracellular vesicles: structure, function, and potential clinical uses in renal diseases. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 46(10), 824–830. <https://doi.org/10.1590/1414-431x20132964>
- Bou, G., Liu, S., Sun, M., Zhu, J., Xue, B., Guo, J., Zhao, Y., Qu, B., Weng, X., Wei, Y., Lei, L., & Liu, Z. (2017). CDX2 is essential for cell proliferation and polarity in porcine blastocysts. *Development*. <https://doi.org/10.1242/dev.141085>
- Bradley, J., & Swann, K. (2019). Mitochondria and lipid metabolism in mammalian oocytes and early embryos. *The International Journal of Developmental Biology*, 63(3-4-5), 93–103. <https://doi.org/10.1387/ijdb.180355ks>
- Calzada, E., Onguka, O., & Claypool, S. M. (2016). Phosphatidylethanolamine Metabolism in Health and Disease. *International Review of Cell and Molecular Biology*, 29–88.
<https://doi.org/10.1016/bs.ircmb.2015.10.001>
- Capra, E., Michal Andrzej Kosior, Cocchia, N., Lazzari, B., Chiara Del Prete, Longobardi, V.,

- Pizzi, F., Stella, A., Frigerio, R., Cretich, M., Anna Lange Consiglio, & Gasparrini, B. (2022). Variations of follicular fluid extracellular vesicles miRNAs content in relation to development stage and season in buffalo. *Scientific Reports*, 12(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-022-18438-8>
- Carney, R. P., Mizenko, R. R., Bozkurt, B. T., Lowe, N., Henson, T., Arizzi, A., Wang, A., Tan, C., & George, S. C. (2024). Harnessing extracellular vesicle heterogeneity for diagnostic and therapeutic applications. *Nature Nanotechnology*. <https://doi.org/10.1038/s41565-024-01774-3>
- Carracedo, A., Cantley, L. C., & Pandolfi, P. P. (2013). Cancer metabolism: fatty acid oxidation in the limelight. *Nature Reviews Cancer*, 13(4), 227–232. <https://doi.org/10.1038/nrc3483>
- Cetica, P., Pintos, L., Dalvit, G., & Beconi, M. (2002). Activity of key enzymes involved in glucose and triglyceride catabolism during bovine oocyte maturation in vitro. *Reproduction (Cambridge, England)*, 124(5), 675–681. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12417006/>
- Chandel, N. S. (2021a). Glycolysis. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 13(5), a040535. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a040535>
- Chandel, N. S. (2021b). Lipid Metabolism. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 13(9), a040576. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a040576>
- Chiaradia, E., Tancini, B., Emiliani, C., Delo, F., Pellegrino, R. M., Tognoloni, A., Urbanelli, L., & Buratta, S. (2021). Extracellular Vesicles under Oxidative Stress Conditions: Biological Properties and Physiological Roles. *Cells*, 10(7), 1763. <https://doi.org/10.3390/cells10071763>
- Clarke, H. J. (2022). Transzonal projections: Essential structures mediating intercellular communication in the mammalian ovarian follicle. *Molecular Reproduction and*

- Development*, 89(11), 509–525. <https://doi.org/10.1002/mrd.23645>
- Cortvrindt, R., & Smitz, J. (2001). *In vitro* Follicle Growth: Achievements in Mammalian Species. *Reproduction in Domestic Animals*, 36(1), 3–9. <https://doi.org/10.1046/j.1439-0531.2001.00261.x>
- da Silveira, J. C., Andrade, G. M., Maite del Collado, Sampaio, R. V., Sangalli, J. R., Silva, L. A., Fábio V. L. Pinaffi, Jardim, I. B., Cesar, M. C., Marcelo, Aline, Coutinho, L. L., Pereira, R. W., Perecin, F., & Meirelles, F. V. (2017). *Supplementation with small-extracellular vesicles from ovarian follicular fluid during in vitro production modulates bovine embryo development*. 12(6), e0179451–e0179451. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0179451>
- da Silveira, J. C., D.N. Rao Veeramachaneni, Winger, Q. A., Carnevale, E. M., & Bouma, G. J. (2012). Cell-Secreted Vesicles in Equine Ovarian Follicular Fluid Contain miRNAs and Proteins: A Possible New Form of Cell Communication Within the Ovarian Follicle1. *Biology of Reproduction*, 86(3). <https://doi.org/10.1095/biolreprod.111.093252>
- de Almeida Monteiro Melo Ferraz, M., Fujihara, M., Nagashima, J. B., Noonan, M. J., Inoue-Murayama, M., & Songsasen, N. (2020). Follicular extracellular vesicles enhance meiotic resumption of domestic cat vitrified oocytes. *Scientific Reports*, 10(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-020-65497-w>
- de Ávila, A. C. F. C. M., & da Silveira, J. C. (2020). Role of extracellular vesicles during oocyte maturation and early embryo development. *Reproduction, Fertility and Development*, 32(2), 56. <https://doi.org/10.1071/rd19389>
- de Carvalho, C., & Caramujo, M. (2018). The Various Roles of Fatty Acids. *Molecules*, 23(10), 2583. <https://doi.org/10.3390/molecules23102583>
- de Lima, C. B., Ferreira, C. R., Milazzotto, M. P., Sobreira, T. J. P., Vireque, A. A., & Cooks,

- R. G. (2018). Comprehensive lipid profiling of early stage oocytes and embryos by MRM profiling. *Journal of Mass Spectrometry*, 53(12), 1247–1252. <https://doi.org/10.1002/jms.4301>
- Deutsch, D. R., Fröhlich, T., Otte, K. A., Beck, A., Habermann, F. A., Wolf, E., & Arnold, G. J. (2014). Stage-Specific Proteome Signatures in Early Bovine Embryo Development. *Journal of Proteome Research*, 13(10), 4363–4376. <https://doi.org/10.1021/pr500550t>
- Diamante, L., & Martello, G. (2022). Metabolic regulation in pluripotent stem cells. *Current Opinion in Genetics & Development*, 75, 101923. <https://doi.org/10.1016/j.gde.2022.101923>
- Doyle, L., & Wang, M. (2019). Overview of Extracellular Vesicles, Their Origin, Composition, Purpose, and Methods for Exosome Isolation and Analysis. *Cells*, 8(7), 727. <https://doi.org/10.3390/cells8070727>
- Dumesic, D. A., Meldrum, D. R., Katz-Jaffe, M. G., Krisher, R. L., & Schoolcraft, W. B. (2015). Oocyte environment: follicular fluid and cumulus cells are critical for oocyte health. *Fertility and Sterility*, 103(2), 303–316. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2014.11.015>
- Dunning, K. R., Russell, D. L., & Robker, R. L. (2014). Lipids and oocyte developmental competence: the role of fatty acids and β -oxidation. *REPRODUCTION*, 148(1), R15–R27. <https://doi.org/10.1530/rep-13-0251>
- Dyall, S. C., Balas, L., Bazan, N. G., Brenna, J. T., Chiang, N., da Costa Souza, F., Dalli, J., Durand, T., Galano, J.-M., Lein, P. J., Serhan, C. N., & Taha, A. Y. (2022). Polyunsaturated fatty acids and fatty acid-derived lipid mediators: Recent advances in the understanding of their biosynthesis, structures, and functions. *Progress in Lipid Research*, 86, 101165. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2022.101165>
- Eldh, M., Ekström, K., Valadi, H., Sjöstrand, M., Olsson, B., Jernås, M., & Lötval, J. (2010).

- Exosomes Communicate Protective Messages during Oxidative Stress; Possible Role of Exosomal Shuttle RNA. *PLoS ONE*, 5(12), e15353. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0015353>
- Emura, N., Sakurai, N., Takahashi, K., Hashizume, T., & Sawai, K. (2016). OCT-4 expression is essential for the segregation of trophectoderm lineages in porcine preimplantation embryos. *Journal of Reproduction and Development*, 62(4), 401–408. <https://doi.org/10.1262/jrd.2016-040>
- Eppig, J. J., O'Brien, M., & Wigglesworth, K. (1996). Mammalian oocyte growth and development in vitro. *Molecular Reproduction and Development*, 44(2), 260–273. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1098-2795\(199606\)44:2%3C260::aid-mrd17%3E3.0.co;2-6](https://doi.org/10.1002/(sici)1098-2795(199606)44:2%3C260::aid-mrd17%3E3.0.co;2-6)
- Farese, R. V., & Walther, T. C. (2009). Lipid Droplets Finally Get a Little R-E-S-P-E-C-T. *Cell*, 139(5), 855–860. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.11.005>
- Ferré, L. B., Kjelland, M. E., Strøbech, L. B., Hyttel, P., Mermillod, P., & Ross, P. J. (2020). Review: Recent advances in bovine in vitro embryo production: reproductive biotechnology history and methods. *Animal*, 14(5), 991–1004. <https://doi.org/10.1017/s1751731119002775>
- Fiorentino, G., Merico, V., Zanoni, M., Comincini, S., Sproviero, D., Garofalo, M., Gagliardi, S., Cereda, C., Lin, C.-J., Innocenti, F., Taggi, M., Vaiarelli, A., Ubaldi, F. M., Rienzi, L., Cimadomo, D., Garagna, S., & Zuccotti, M. (2024). Extracellular vesicles secreted by cumulus cells contain microRNAs that are potential regulatory factors of mouse oocyte developmental competence. *Molecular Human Reproduction*, 30(6), gaae019. <https://doi.org/10.1093/molehr/gaae019>
- Gabryś, J., Kij-Mitka, B., Sawicki, S., Kochan, J., Nowak, A., Łojko, J., Karnas, E., & Bugno-Poniewierska, M. (2022). Extracellular vesicles from follicular fluid may improve the

- nuclear maturation rate of in vitro matured mare oocytes. *Theriogenology*, 188, 116–124. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2022.05.022>
- Gebremedhn, S., Gad, A., Aglan, H. S., Laurincik, J., Prochazka, R., Salilew-Wondim, D., Hoelker, M., Schellander, K., & Tesfaye, D. (2020). Extracellular vesicles shuttle protective messages against heat stress in bovine granulosa cells. *Scientific Reports*, 10(1), 15824. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-72706-z>
- Ghanem, N., Ha, A-Na., Fakruzzaman, Md., Bang, J.-I., Lee, S.-C., & Kong, I.-K. (2014). Differential expression of selected candidate genes in bovine embryos produced in vitro and cultured with chemicals modulating lipid metabolism. *Theriogenology*, 82(2), 238–250. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2014.03.024>
- Gopichandran, N., & Leese, H. (2003). Metabolic characterization of the bovine blastocyst, inner cell mass, trophectoderm and blastocoel fluid. *Reproduction*, 299–308. <https://doi.org/10.1530/rep.0.1260299>
- H Niemann, & Wrenzycki, C. (2018). *Animal biotechnology. 1, Reproductive biotechnologies*. Springer.
- Han, X., & Gross, R. W. (2022). The foundations and development of lipidomics. *Journal of Lipid Research*, 63(2), 100164. <https://doi.org/10.1016/j.jlr.2021.100164>
- Hao, Y., Lai, L., Mao, J., Im, G.-S., Bonk, A., & Prather, R. S. (2004). Apoptosis in Parthenogenetic Preimplantation Porcine Embryos¹. *Biology of Reproduction*, 70(6), 1644–1649. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.103.026005>
- Hasan, M. M., Viil, J., Lättekivi, F., Ord, J., Reshi, Q. U. A., Jääger, K., Velthut-Meikas, A., Andronowska, A., Jaakma, Ü., Salumets, A., & Fazeli, A. (2020). Bovine Follicular Fluid and Extracellular Vesicles Derived from Follicular Fluid Alter the Bovine Oviductal Epithelial Cells Transcriptome. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(15), 5365. <https://doi.org/10.3390/ijms21155365>

- Hayder, H., O'Brien, J., Nadeem, U., & Peng, C. (2018). MicroRNAs: crucial regulators of placental development. *Reproduction*, *155*(6), R259–R271. <https://doi.org/10.1530/rep-17-0603>
- Henne, W. M., Reese, M. L., & Goodman, J. M. (2018). The assembly of lipid droplets and their roles in challenged cells. *The EMBO Journal*, *37*(12). <https://doi.org/10.15252/emboj.201898947>
- Hung, W.-T., Hong, X., Christenson, L. K., & McGinnis, L. K. (2015). Extracellular Vesicles from Bovine Follicular Fluid Support Cumulus Expansion1. *Biology of Reproduction*, *93*(5). <https://doi.org/10.1095/biolreprod.115.132977>
- Ibayashi, M., Aizawa, R., Mitsui, J., & Tsukamoto, S. (2021). Homeostatic regulation of lipid droplet content in mammalian oocytes and embryos. *Reproduction*, *162*(6), R99–R109. <https://doi.org/10.1530/rep-21-0238>
- Janati Idrissi, S., Le Bourhis, D., Lefevre, A., Emond, P., Le Berre, L., Desnoës, O., Joly, T., Buff, S., Maillard, V., Schibler, L., Salvetti, P., & Elis, S. (2021). Lipid profile of bovine grade-1 blastocysts produced either in vivo or in vitro before and after slow freezing process. *Scientific Reports*, *11*(1), 11618. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-90870-8>
- Jeppesen, D. K., Zhang, Q., Franklin, J. L., & Coffey, R. J. (2023). Extracellular vesicles and nanoparticles: emerging complexities. *Trends in Cell Biology*. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2023.01.002>
- Kajdasz, A., Warzych, E., Derebecka, N., Madeja, Z. E., Lechniak, D., Wesoly, J., & Pawlak, P. (2020). Lipid Stores and Lipid Metabolism Associated Gene Expression in Porcine and Bovine Parthenogenetic Embryos Revealed by Fluorescent Staining and RNA-seq. *International Journal of Molecular Sciences*, *21*(18), 6488. <https://doi.org/10.3390/ijms21186488>
- Kaneko, K. J. (2016). Metabolism of Preimplantation Embryo Development. *Current Topics in*

- Developmental Biology*, 120, 259–310. <https://doi.org/10.1016/bs.ctdb.2016.04.010>
- Khan, R., Jiang, X., Hameed, U., & Shi, Q. (2021). Role of Lipid Metabolism and Signaling in Mammalian Oocyte Maturation, Quality, and Acquisition of Competence. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 9. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.639704>
- Kikuchi, K., Ekwall, H., Tienthai, P., Kawai, Y., Noguchi, J., Kaneko, H., & Rodriguez-Martinez, H. (2002). Morphological features of lipid droplet transition during porcine oocyte fertilisation and early embryonic development to blastocyst in vivo and in vitro. *Zygote*, 10(4), 355–366. <https://doi.org/10.1017/s0967199402004100>
- Kimura, T., Jennings, W., & Epand, R. M. (2016). Roles of specific lipid species in the cell and their molecular mechanism. *Progress in Lipid Research*, 62, 75–92. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2016.02.001>
- Kirioukhova, O., Shah, J. N., Larsen, D. S., Muhammad Tayyab, Mueller, N. E., Govind, G., Célia Baroux, Federer, M., Gheyselinck, J., Barrell, P. J., Ma, H., Sprunck, S., Huettel, B., Wallace, H., Ueli Grossniklaus, & Johnston, A. J. (2018). Aberrant imprinting may underlie evolution of parthenogenesis. *Scientific Reports*, 8(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-018-27863-7>
- Krzymowski, T. (2007). *Biologia rozrodu zwierząt*. Wydawnictwo Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego.
- Langbeen, A., De Porte, H. F. M., Bartholomeus, E., Leroy, J. L. M. R., & Bols, P. E. J. (2015). Bovine in vitro reproduction models can contribute to the development of (female) fertility preservation strategies. *Theriogenology*, 84(4), 477–489. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2015.04.009>
- Lee, D.-K., Choi, K.-H., Hwang, J. Y., Oh, J.-N., Kim, S.-H., & Lee, C.-K. (2018). Stearoyl-coenzyme A desaturase 1 is required for lipid droplet formation in pig embryo. *Reproduction*, 157(3), 235–243. <https://doi.org/10.1530/rep-18-0556>

- Leese, H. J. (2012). Metabolism of the preimplantation embryo: 40 years on. *Reproduction (Cambridge, England)*, 143(4), 417–427. <https://doi.org/10.1530/REP-11-0484>
- Leroy, J. L. M. R., Vanholder, T., Mateusen, B., Christophe, A. B., Opsomer, G., de Kruif, A., Genicot, G., & Van Soom, A. (2005). Non-esterified fatty acids in follicular fluid of dairy cows and their effect on developmental capacity of bovine oocytes in vitro. *Reproduction*, 130(4), 485–495. <https://doi.org/10.1530/rep.1.00735>
- Li, X., Zou, C., Li, M., Fang, C., Li, K., Liu, Z., & Li, C. (2021). Transcriptome Analysis of In Vitro Fertilization and Parthenogenesis Activation during Early Embryonic Development in Pigs. *Genes*, 12(10), 1461. <https://doi.org/10.3390/genes12101461>
- Lipinska, P., Pawlak, P., & Ewelina Warzych. (2023). Species and embryo genome origin affect lipid droplets in preimplantation embryos. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 11. <https://doi.org/10.3389/fcell.2023.1187832>
- Lipinska, P., Sell-Kubiak, E., Pawlak, P., Madeja, Z. E., & Warzych, E. (2021). Response of Bovine Cumulus-Oocytes Complexes to Energy Pathway Inhibition during In Vitro Maturation. *Genes*, 12(6), 838. <https://doi.org/10.3390/genes12060838>
- Lipinska, P., Smits, K., Van Soom, A., Pavani, K. C., & Warzych, E. (2025). Follicular fluid extracellular vesicles support energy metabolism of bovine oocytes, improving blastocyst development and quality†. *Biology of Reproduction*, ioaf096. <https://doi.org/10.1093/biolre/ioaf096>
- Liu, H., Wang, S., Wang, J., Guo, X., Song, Y., Fu, K., Gao, Z., Liu, D., He, W., & Yang, L.-L. (2025). Energy metabolism in health and diseases. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 10(1). <https://doi.org/10.1038/s41392-025-02141-x>
- Lonergan, P., & Fair, T. (2016). Maturation of Oocytes in Vitro. *Annual Review of Animal Biosciences*, 4(1), 255–268. <https://doi.org/10.1146/annurev-animal-022114-110822>
- López-Casillas, F., Bai, D. H., Luo, X. C., Kong, I. S., Hermodson, M. A., & Kim, K. H. (1988).

- Structure of the coding sequence and primary amino acid sequence of acetyl-coenzyme A carboxylase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 85(16), 5784–5788.
<https://doi.org/10.1073/pnas.85.16.5784>
- Luo, L., Ye, G., Nadeem, L., Fu, G., Yang, B. B., Dunk, C., Lye, S., & Peng, C. (2012). MicroRNA-378a-5p promotes trophoblast cell survival, migration and invasion by targeting Nodal. *Journal of Cell Science*. <https://doi.org/10.1242/jcs.096412>
- Lussier, J. G., Matton, P., & Dufour, J. J. (1987). Growth rates of follicles in the ovary of the cow. *Journal of Reproduction and Fertility*, 81(2), 301–307.
<https://doi.org/10.1530/jrf.0.0810301>
- Macaulay, A. D., Gilbert, I., Caballero, J., Barreto, R., Fournier, E., Tossou, P., Sirard, M.-A., Clarke, H. J., Khandjian, É. W., Richard, F. J., Hyttel, P., & Robert, C. (2014). The gametic synapse: RNA transfer to the bovine oocyte. *Biology of Reproduction*, 91(4), 90. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.114.119867>
- Macaulay, A. D., Gilbert, I., Scantland, S., Fournier, E., Ashkar, F., Bastien, A., Saadi, H. A. S., Gagné, D., Sirard, M.-A., Khandjian, É. W., Richard, F. J., Hyttel, P., & Robert, C. (2016). Cumulus Cell Transcripts Transit to the Bovine Oocyte in Preparation for Maturation1. *Biology of Reproduction*, 94(1).
<https://doi.org/10.1095/biolreprod.114.127571>
- Marchais, M., Gilbert, I., Bastien, A., Macaulay, A., & Robert, C. (2022). Mammalian cumulus-oocyte complex communication: a dialog through long and short distance messaging. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 39(5), 1011–1025.
<https://doi.org/10.1007/s10815-022-02438-8>
- Martinez, R. M., Liang, L., Racowsky, C., Dioni, L., Mansur, A., Adir, M., Bollati, V., Baccarelli, A. A., Hauser, R., & Machtinger, R. (2018). Extracellular microRNAs profile in human follicular fluid and IVF outcomes. *Scientific Reports*, 8(1).

<https://doi.org/10.1038/s41598-018-35379-3>

- Matsuno, Y., Onuma, A., Fujioka, Y. A., Yasuhara, K., Fuji, W., Naito, K., & Sugiura, K. (2017). Effects of exosome-like vesicles on cumulus expansion in pigs *in vitro*. *Journal of Reproduction and Development*, 63(1), 51–58. <https://doi.org/10.1262/jrd.2016-124>
- Mau, K. H. T., Karimlou, D., Barneda, D., Brochard, V., Royer, C., Leeke, B., de, A., Pailles, M., Percharde, M., Srinivas, S., Jouneau, A., Christian, M., & Azuara, V. (2022). Dynamic enlargement and mobilization of lipid droplets in pluripotent cells coordinate morphogenesis during mouse peri-implantation development. *Nature Communications*, 13(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-022-31323-2>
- McEvoy, T. G., Coull, G. D., Broadbent, P. J., Hutchinson, J. S., & Speake, B. K. (2000). Fatty acid composition of lipids in immature cattle, pig and sheep oocytes with intact zona pellucida. *Journal of Reproduction and Fertility*, 118(1), 163–170. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10793638/>
- Meşe, G., Richard, G., & White, T. W. (2007). Gap Junctions: Basic Structure and Function. *Journal of Investigative Dermatology*, 127(11), 2516–2524. <https://doi.org/10.1038/sj.jid.5700770>
- Miao, Y.-L., & Williams, C. J. (2012). Calcium signaling in mammalian egg activation and embryo development: The influence of subcellular localization. *Molecular Reproduction and Development*, 79(11), 742–756. <https://doi.org/10.1002/mrd.22078>
- Milazzotto, M. P., de Lima, C. B., da Fonseca, A. M., Dos Santos, E. C., & Ispada, J. (2020). Erasing gametes to write blastocysts: metabolism as the new player in epigenetic reprogramming. *Animal Reproduction*, 17(3), e20200015. <https://doi.org/10.1590/1984-3143-AR2020-0015>
- Milazzotto, M. P., Noonan, M. J., & Ferraz, M. (2022). Mining RNAseq data reveals dynamic metaboloepigenetic profiles in human, mouse and bovine pre-implantation embryos.

- IScience*, 25(3), 103904–103904. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2022.103904>
- Moore, S. G., & Hasler, J. F. (2017). A 100-Year Review: Reproductive technologies in dairy science. *Journal of Dairy Science*, 100(12), 10314–10331. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13138>
- Mori, M., Otoi, T., & Suzuki, T. (2002). Correlation between the Cell Number and Diameter in Bovine Embryos Produced *In Vitro*. *Reproduction in Domestic Animals*, 37(3), 181–184. <https://doi.org/10.1046/j.1439-0531.2002.00354.x>
- Morita, S., & Ikeda, Y. (2022). Regulation of membrane phospholipid biosynthesis in mammalian cells. *Biochemical Pharmacology*, 206, 115296. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2022.115296>
- Neyroud, A.-S., Chiechio, R. M., Moulin, G., Ducarre, S., Heichette, C., Dupont, A., Budzynski, M., Even-Hernandez, P., Faro, M. J. L., Yefimova, M., Marchi, V., & Ravel, C. (2022). Diversity of Extracellular Vesicles in Human Follicular Fluid: Morphological Analysis and Quantification. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(19), 11676. <https://doi.org/10.3390/ijms231911676>
- Nihad, M., Sen, U., Chaudhury, D., Das, U. N., Shenoy P, S., & Bose, B. (2023). Arachidonic acid modulates the cellular energetics of human pluripotent stem cells and protects the embryoid bodies from embryotoxicity effects in vitro. *Reproductive Toxicology (Elmsford, N.Y.)*, 120, 108438. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2023.108438>
- Olzmann, J. A., & Carvalho, P. (2019). Dynamics and functions of lipid droplets. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 20(3), 137–155. <https://doi.org/10.1038/s41580-018-0085-z>
- Ongeri, E. M., & Krisher, R. L. (2001). Glucose and Pyruvate Metabolism of Preimplantation Goat Blastocysts following *In Vitro* Fertilization and Parthenogenetic Activation. *Cloning and Stem Cells*, 3(3), 115–123. <https://doi.org/10.1089/153623001753205070>

- Parrish, J. J., Susko-Parrish, J. L., Leibfried-Rutledge, M. L., Critser, E. S., Eyestone, W. H., & First, N. L. (1986). Bovine in vitro fertilization with frozen-thawed semen. *Theriogenology*, 25(4), 591–600. [https://doi.org/10.1016/0093-691x\(86\)90143-3](https://doi.org/10.1016/0093-691x(86)90143-3)
- Pavani, K. C., Meese, T., Pascottini, O. B., Guan, X., Lin, X., Peelman, L., Hamacher, J., Nieuwerburgh, F. V., Deforce, D., Boel, A., Heindryckx, B., Tilleman, K., Soom, A. V., Gadella, B. M., Hendrix, A., & Smits, K. (2022). Hatching is modulated by microRNA-378a-3p derived from extracellular vesicles secreted by blastocysts. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 119(12). <https://doi.org/10.1073/pnas.2122708119>
- Pawlak, P., Lipinska, P., Sell-Kubiak, E., Kajdasz, A., Derebecka, N., & Warzych, E. (2024). Energy metabolism disorders during in vitro maturation of bovine cumulus-oocyte complexes interfere with blastocyst quality and metabolism. *Developmental Biology*, 509, 51–58. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2024.02.004>
- Pawlak, P., Malyszka, N., Szczerbal, I., & Kolodziejwski, P. (2020). Fatty acid induced lipolysis influences embryo development, gene expression and lipid droplet formation in the porcine cumulus cells†. *Biology of Reproduction*, 103(1), 36–48. <https://doi.org/10.1093/biolre/ioaa045>
- Piliszek, A., & Madeja, Z. E. (2018). Pre-implantation Development of Domestic Animals. *Current Topics in Developmental Biology/Current Topics in Developmental Biology*, 267–294. <https://doi.org/10.1016/bs.ctdb.2017.11.005>
- Popiołek, K., & Grzesiak, M. (2019). Egzosomy jako nowy element komunikacji w pęcherzyku jajnikowym ssaków. *Postępy Biochemii*. https://doi.org/10.18388/pb.2019_276
- Pu, L., Shahzad, Q., Chen, F., Yao, S., Tang, Y., Chen, D., Yu, K., Xie, L., Xu, H., Zhang, M., & Lu, Y. (2020). Proteomic analysis demonstrates that parthenogenetically activated swamp buffalo embryos have dysregulated energy metabolism. *Reproduction in*

- Domestic Animals*, 55(12), 1764–1773. <https://doi.org/10.1111/rda.13838>
- Rinaldo, P., Matern, D., & Bennett, M. J. (2002). Fatty Acid Oxidation Disorders. *Annual Review of Physiology*, 64(1), 477–502. <https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.64.082201.154705>
- Rodrigues, T. A., Tuna, K. M., Alli, A. A., Tribulo, P., Hansen, P. J., Koh, J., & Paula-Lopes, F. F. (2019). Follicular fluid exosomes act on the bovine oocyte to improve oocyte competence to support development and survival to heat shock. *Reproduction Fertility and Development*, 31(5), 888–888. <https://doi.org/10.1071/rd18450>
- Rodwell, V. W., Bender, D. A., Botham, K. M., Kennelly, P. J., Weil, P. A., Smoleński, R. T., Gross, P. L., & Harper, H. A. (2018). *Biochemia Harpera ilustrowana*. Pzwl Wydawnictwo Lekarskie.
- Rosario, del, Demyda, E., Moreno, M. M., & género, E. (2011). Developmental competence of in vivo and in vitro matured oocytes: A review. *ResearchGate*, 6(7), 155–165.
- Sakurai, N., Takahashi, K., Emura, N., Fujii, T., Hirayama, H., Kageyama, S., Hashizume, T., & Sawai, K. (2016). The Necessity of OCT-4 and CDX2 for Early Development and Gene Expression Involved in Differentiation of Inner Cell Mass and Trophectoderm Lineages in Bovine Embryos. *Cellular Reprogramming*, 18(5), 309–318. <https://doi.org/10.1089/cell.2015.0081>
- Sanchez-Lazo, L., Brisard, D., Elis, S., Maillard, V., Uzbekov, R., Labas, V., Desmarchais, A., Papillier, P., Monget, P., & Uzbekova, S. (2014). Fatty Acid Synthesis and Oxidation in Cumulus Cells Support Oocyte Maturation in Bovine. *Molecular Endocrinology*, 28(9), 1502–1521. <https://doi.org/10.1210/me.2014-1049>
- Shi, M., & Sirard, M.-A. (2022). Metabolism of fatty acids in follicular cells, oocytes, and blastocysts. *Reproduction & Fertility*, 3(2), R96–R108. <https://doi.org/10.1530/raf-21-0123>

- Singh, B., Mal, G., Gautam, S. K., & Mukesh, M. (2019). Parthenogenesis—A Potential Tool to Reproductive Biotechnology. *Advances in Animal Biotechnology*, 239–248. https://doi.org/10.1007/978-3-030-21309-1_22
- Slotte, J. P. (2013). Biological functions of sphingomyelins. *Progress in Lipid Research*, 52(4), 424–437. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2013.05.001>
- Sohel, M. M. H., Hoelker, M., Noferesti, S. S., Salilew-Wondim, D., Tholen, E., Looft, C., Rings, F., Uddin, M. J., Spencer, T. E., Schellander, K., & Tesfaye, D. (2013). Exosomal and Non-Exosomal Transport of Extra-Cellular microRNAs in Follicular Fluid: Implications for Bovine Oocyte Developmental Competence. *PloS One*, 8(11), e78505. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0078505>
- Stojkovic, M., Machado, S. A., Stojkovic, P., Zakhartchenko, V., Hutzler, P., Gonçalves P. B., & Wolf, E. (2001). Mitochondrial Distribution and Adenosine Triphosphate Content of Bovine Oocytes Before and After In Vitro Maturation: Correlation with Morphological Criteria and Developmental Capacity After In Vitro Fertilization and Culture1. *Biology of Reproduction*, 64(3), 904–909. <https://doi.org/10.1095/biolreprod64.3.904>
- Sudano, M. J., Paschoal, D. M., da Silva Rascado, T., Magalhães, L. C. O., Crocomo, L. F., de Lima-Neto, J. F., & da Cruz Landim-Alvarenga, F. (2011). Lipid content and apoptosis of in vitro-produced bovine embryos as determinants of susceptibility to vitrification. *Theriogenology*, 75(7), 1211–1220. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2010.11.033>
- Sudano, M. J., Rascado, T. D. S., Tata, A., Belaz, K. R. A., Santos, V. G., Valente, R. S., Mesquita, F. S., Ferreira, C. R., Araújo, J. P., Eberlin, M. N., & Landim-Alvarenga, F. D. C. (2016). Lipidome signatures in early bovine embryo development. *Theriogenology*, 86(2), 472–484.e1. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.03.025>

- Sutton-McDowall, M. L., Gilchrist, R. B., & Thompson, J. G. (2005). Effect of hexoses and gonadotrophin supplementation on bovine oocyte nuclear maturation during in vitro maturation in a synthetic follicle fluid medium. *Reproduction Fertility and Development*, 17(4), 407–407. <https://doi.org/10.1071/rd04135>
- Sutton-McDowall, M. L., Gilchrist, R. B., & Thompson, J. G. (2010). The pivotal role of glucose metabolism in determining oocyte developmental competence. *Reproduction (Cambridge, England)*, 139(4), 685–695. <https://doi.org/10.1530/REP-09-0345>
- Tanosaki, S., Tohyama, S., Fujita, J., Someya, S., Hishiki, T., Matsuura, T., Nakanishi, H., Ohto-Nakanishi, T., Akiyama, T., Morita, Y., Kishino, Y., Okada, M., Tani, H., Soma, Y., Nakajima, K., Kanazawa, H., Sugimoto, M., Ko, M. S. H., Suematsu, M., & Fukuda, K. (2020). Fatty Acid Synthesis Is Indispensable for Survival of Human Pluripotent Stem Cells. *IScience*, 23(9), 101535. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2020.101535>
- Telfer, E. E., Sakaguchi, K., Clarkson, Y. L., & McLaughlin, M. (2020). In vitro growth of immature bovine follicles and oocytes. *Reproduction, Fertility and Development*, 32(2), 1. <https://doi.org/10.1071/rd19270>
- Tipney, H., & Hunter, L. (2010). An introduction to effective use of enrichment analysis software. *Human Genomics*, 4(3), 202. <https://doi.org/10.1186/1479-7364-4-3-202>
- Valckx, S. D., Arias-Alvarez, M., De Pauw, I., Fievez, V., Vlaeminck, B., Fransen, E., Bols, P. E., & Leroy, J. L. (2014). Fatty acid composition of the follicular fluid of normal weight, overweight and obese women undergoing assisted reproductive treatment: a descriptive cross-sectional study. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 12(1), 13. <https://doi.org/10.1186/1477-7827-12-13>
- van der Veen, J. N., Kennelly, J. P., Wan, S., Vance, J. E., Vance, D. E., & Jacobs, R. L. (2017). The critical role of phosphatidylcholine and phosphatidylethanolamine metabolism in health and disease. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1859(9, Part

- B), 1558–1572. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2017.04.006>
- Van Hoeck, V., Sturmey, R. G., Bermejo-Álvarez, P., Rizos, D., Gutiérrez-Adán, A., Leese, H. J., Bols, P. E. J., & Leroy, J. (2011). Elevated Non-Esterified Fatty Acid Concentrations during Bovine Oocyte Maturation Compromise Early Embryo Physiology. *PLOS ONE*, 6(8), e23183–e23183. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0023183>
- van Niel, G., D’Angelo, G., & Raposo, G. (2018). Shedding light on the cell biology of extracellular vesicles. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 19(4), 213–228. <https://doi.org/10.1038/nrm.2017.125>
- van Soom, A., Ysebaert, M.-T., & de Kruif, A. (1997). Relationship between timing of development, morula morphology, and cell allocation to inner cell mass and trophectoderm in in vitro-produced bovine embryos. *Molecular Reproduction and Development*, 47(1), 47–56. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1098-2795\(199705\)47:1%3C47::aid-mrd7%3E3.0.co;2-q](https://doi.org/10.1002/(sici)1098-2795(199705)47:1%3C47::aid-mrd7%3E3.0.co;2-q)
- Wang, T., Fu, X., Chen, Q., Patra, J. K., Wang, D., Wang, Z., & Gai, Z. (2019). Arachidonic Acid Metabolism and Kidney Inflammation. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(15). <https://doi.org/10.3390/ijms20153683>
- Warzych, E., & Lipinska, P. (2020). Energy metabolism of follicular environment during oocyte growth and maturation. *The Journal of Reproduction and Development*, 66(1), 1–7. <https://doi.org/10.1262/jrd.2019-102>
- Warzych, E., Lipinska, P., & Sell-Kubiak, E. (2024). Pentose phosphate pathway inhibition during in vitro maturation substantially affects the metabolism of bovine COCs and blastocysts. *Theriogenology*, 230, 72–80. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2024.09.009>
- Warzych, E., Pawlak, P., Lechniak, D., & Madeja, Z. E. (2020). WNT signalling supported by MEK/ERK inhibition is essential to maintain pluripotency in bovine preimplantation

- embryo. *Developmental Biology*, 463(1), 63–76.
<https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2020.04.004>
- Watson, A. J. (2007). Oocyte cytoplasmic maturation: A key mediator of oocyte and embryo developmental competence¹. *Journal of Animal Science*, 85(suppl_13), E1–E3.
<https://doi.org/10.2527/jas.2006-432>
- Welsh, J. A., Goberdhan, D. C. I., O’Driscoll, L., Buzas, E. I., Blenkiron, C., Bussolati, B., Cai, H., Di Vizio, D., Driedonks, T. A. P., Erdbrügger, U., Falcon-Perez, J. M., Fu, Q.-L., & et al. (2024). Minimal information for studies of extracellular vesicles (MISEV2023): From basic to advanced approaches. *Journal of Extracellular Vesicles*, 13(2), e12404.
<https://doi.org/10.1002/jev2.12404>
- Wolfe, R. R. (1998). Metabolic interactions between glucose and fatty acids in humans. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 67(3), 519S–526S.
<https://doi.org/10.1093/ajcn/67.3.519s>
- Xiang, F., Zhang, Z., Xie, J., Xiong, S., Yang, C., Liao, D., Xia, B., & Lin, L. (2025). Comprehensive review of the expanding roles of the carnitine pool in metabolic physiology: beyond fatty acid oxidation. *Journal of Translational Medicine*, 23(1).
<https://doi.org/10.1186/s12967-025-06341-5>
- Xie, J., Xu, X., & Liu, S. (2023). Intercellular communication in the cumulus–oocyte complex during folliculogenesis: A review. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 11.
<https://doi.org/10.3389/fcell.2023.1087612>
- Ye, Q., Zeng, X., Cai, S., Qiao, S., & Zeng, X. (2021). Mechanisms of lipid metabolism in uterine receptivity and embryo development. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, 32(12), 1015–1030. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2021.09.002>
- Ying, W., Yunqi, Z., Zimeng, L., Kangning, X., Deji, L., Chen, Q., Yong, Z., & Fusheng, Q. (2022). Large extracellular vesicles in bovine follicular fluid inhibit the apoptosis of

- granulosa cell and stimulate the production of steroid hormones. *Theriogenology*, 195, 149–158. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2022.10.027>
- Yoshioka, K., Uchikura, K., Suda, T., & Matoba, S. (2020). Production of piglets from in vitro-produced blastocysts by ultrasound-guided ovum pick-up from live donors. *Theriogenology*, 141, 113–119. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2019.09.019>
- Yu, J., & Li, P. (2016). The size matters: regulation of lipid storage by lipid droplet dynamics. *Science China Life Sciences*, 60(1), 46–56. <https://doi.org/10.1007/s11427-016-0322-x>
- Yuan, Y., Spate, L. D., Redel, B. K., Tian, Y., Zhou, J., Prather, R. S., & Roberts, R. M. (2017). Quadrupling efficiency in production of genetically modified pigs through improved oocyte maturation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 114(29). <https://doi.org/10.1073/pnas.1703998114>
- Zechner, R., Madeo, F., & Kratky, D. (2017). Cytosolic lipolysis and lipophagy: two sides of the same coin. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 18(11), 671–684. <https://doi.org/10.1038/nrm.2017.76>
- Zhai, Y., Yu, H., An, X., Zhang, Z., Zhang, M., Zhang, S., Li, Q., & Li, Z. (2022). Profiling the transcriptomic signatures and identifying the patterns of zygotic genome activation – a comparative analysis between early porcine embryos and their counterparts in other three mammalian species. *BMC Genomics*, 23(1). <https://doi.org/10.1186/s12864-022-09015-4>
- Zhao, H., Yang, L., Baddour, J., Achreja, A., Bernard, V., Moss, T., Marini, J. C., Tudawe, T., Seviour, E. G., San Lucas, F. A., Alvarez, H., Gupta, S., Maiti, S. N., Cooper, L., Peehl, D., Ram, P. T., Maitra, A., & Nagrath, D. (2016). Tumor microenvironment derived exosomes pleiotropically modulate cancer cell metabolism. *ELife*, 5. <https://doi.org/10.7554/elife.10250>

Spis figur i tabel

Figura 1. Uproszczony schemat budowy pęcherzyka jajnikowego (grafika własna).

Figura 2. Schemat budowy kropli lipidowej (grafika własna).

Figura 3. Diagram przedstawiający mechanizmy metabolizmu lipidów i glukozy w kompleksie oocyt-cumulus. Lewa część diagramu przedstawia metabolizm lipidów, natomiast prawa część koncentruje się na metabolizmie glukozy. W obu szlakach kluczową rolę odgrywają komórki pęcherzykowe, które pobierają lipidy i glukozę z płynu pęcherzykowego, chronią oocyt przed lipotoksycznością (metabolizm lipidów) lub przekształcają glukozę w pirogronian (metabolizm glukozy). Końcowym produktem metabolizmu zarówno lipidów, jak i glukozy jest ATP (źródło: Warzych & Lipińska, 2020).

Figura 4. Schemat rozwoju zarodka przedimplantacyjnego bydła, wraz ze wskazanymi średnimi czasami, w których dane stadium najczęściej występuje (gpz – godziny po zapłodnieniu) (grafika własna).

Figura 5. Układ doświadczalny eksperymentu nr 1 (grafika własna).

Figura 6. Układ doświadczalny eksperymentu nr 2 (grafika własna).

Figura 7. Wykres przedstawiający wartości liczby blastomerów wchodzących w skład struktury zarodków ze stadiów rozwojowych moruli oraz wczesnej i ekspandującej blastocysty (średnia i odchylenie standardowe). A – porównanie b.IVF vs b.PA, B – porównanie b.PA vs p.PA; **- $p < 0,01$

Figura 8. Wykres przedstawiający zawartość lipidów w przeliczeniu na jedną komórkę, w trzech analizowanych stadiach rozwojowych: moruli oraz wczesnej i ekspandującej blastocysty (średnia i odchylenie standardowe). A – porównanie b.IVF vs b.PA, B – porównanie b.PA vs p.PA; ** - $p < 0.01$

Tabela 1. Tabela podklas lipidów zidentyfikowanych w analizie lipidomicznej wraz z liczbą poszczególnych gatunków lipidów należących do każdej z nich.

Paulina Małgorzata Lipińska-Kranc

imię i nazwisko doktoranta

Oświadczenie autora rozprawy doktorskiej

Niniejszym oświadczam, że przedłożoną rozprawę doktorską pt.:

„Metabolizm energetyczny w oocytach i zarodkach przedimplantacyjnych bydła”

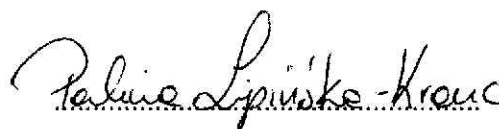
napisałem samodzielnie, tj.:

- nie zleciłem opracowania rozprawy lub jej części innym osobom,
- nie przepisałem rozprawy lub jej części z innych opracowań i prac związanych tematycznie z moją pracą,
- korzystałem jedynie z niezbędnych konsultacji,
- wszystkie elementy rozprawy, które zostały wykorzystane do jej realizacji (cytaty, ryciny, tabele, programy itp.), a nie będące mojego autorstwa, zostały odpowiednio zaznaczone wraz z podaniem źródła ich pochodzenia,
- rozprawa nie była wcześniej przedmiotem procedur związanych z uzyskaniem stopnia naukowego.

Oświadczam ponadto, że niniejsza wersja rozprawy jest identyczna z załączoną wersją elektroniczną.

Mam świadomość, że złożenie nieprawdziwego oświadczenia skutkować będzie niedopuszczeniem do dalszych czynności postępowania w sprawie nadania stopnia doktora lub cofnięciem decyzji o nadaniu mi stopnia doktora oraz wszczęciem postępowania dyscyplinarnego.

Data 19.05.2025



podpis autora rozprawy

Załącznik 1b

Ewelina Warzych-Plejer

.....

imię i nazwisko promotora / ~~promotorów~~ / ~~promotora pomocniczego~~

Oświadczenie promotora(-ów) rozprawy doktorskiej

Oświadczam, że niniejsza rozprawa doktorska pt.: „Metabolizm energetyczny w oocytach i zarodkach przedimplantacyjnych bydła” została przygotowana pod moim kierunkiem i stwierdzam, że spełnia ona warunki do przedstawienia jej w postępowaniu o nadanie stopnia naukowego.

Data 9.05.2025

Podpis promotora rozprawy

Ewelina Warzych-Plejer

~~Podpis promotora / promotora pomocniczego rozprawy~~

Nie dotyczy

.....

Follicular-fluid extracellular vesicles support energy metabolism of bovine oocytes, improving blastocyst development and quality[†]

Paulina Lipinska¹, Katrien Smits², Ann Van Soom², Krishna Chaitanya Pavani^{2,3,*} and Ewelina Warzych^{1,*}

¹Department of Genetics and Animal Breeding, Poznan University of Life Sciences, Poznan, Poland

²Department of Internal Medicine, Reproduction and Population Medicine, Ghent University, Merelbeke, Belgium

³Department for Reproductive Medicine, Ghent University Hospital, Gent, Belgium

***Correspondence:** Department of Genetics and Animal Breeding, Poznan University of Life Sciences, Poznan, Wolynska 33, 60637 Poland. Tel: +48 61 8466119. E-mail: ewelina.warzych@up.poznan.pl; Department of Internal Medicine, Reproduction and Population Medicine, Ghent University, Salisburylaan 133, 9820 Merelbeke, Belgium. Tel: +32 264 7607. E-mail: KrishnaChaitanya.Pavani@UGent.be

†Grant Support: PL was funded by Young Scientist Research Grant 2023 (Grant number: 506.534.05.00) and by statutory funding (506.534.09.00) provided by the Faculty of Veterinary Medicine, Poznan University of Life Sciences as well as the Erasmus+ program. AVS and KS were supported by Bijzonder Onderzoeksfonds GOA (Geconcerteerde onderzoeksacties) 2024000505 (GOA028-24 BOF). KCP was supported by the Research Foundation Flanders (FWO) (grant number: 12A2H24N). The publication was co-financed by the Polish Minister of Science and Higher Education as part of the Strategy of the Poznan University of Life Sciences for 2024-2026 in the field of improving scientific research and development work in priority research areas.

Abstract

Extracellular vesicles (EVs) from follicular fluid (FF) seem to play a significant role in communication within ovarian follicles in several species. The present study aimed to examine the supporting effect of FF-derived small EVs (FF-sEVs) during in vitro maturation (IVM) of bovine cumulus-oocyte complexes (COCs) under conditions of disturbed energy metabolism. Bovine COCs were matured in vitro with inhibitors targeting lipid metabolism (etomoxir) or glucose metabolism (iodoacetate combined with dehydroepiandrosterone), in the presence or absence of FF-sEVs. Following maturation, oocytes and cumulus cells were analyzed by real-time quantitative polymerase chain reaction (qPCR) and stained to visualize lipid droplets. The uptake of FF-sEVs was visualized by fluorescent labeling. In vitro fertilization and embryo culture were followed by mass spectrometry analysis of hatched blastocysts. We demonstrate for the first time that FF-sEVs are transported from the medium into the oocytes, via the cumulus cells and through transzonal projections into the perivitelline space and ooplasm. Cumulus cells under metabolic stress conditions exhibit an increased FF-sEV uptake from the maturation medium. FF-sEV supplementation during metabolic stress conditions enhances the MII rate in oocytes and positively affects subsequent embryo development and quality revealed by altered metabolic activity. Lipid droplet parameters and gene expression in cumulus cells and oocytes are affected by FF-sEV supplementation, which is more pronounced in cumulus cells. Our findings show that FF-sEV supplementation during IVM under metabolic stress conditions significantly affects COCs, with a positive effect on further blastocyst quality. We provide novel insights into the role of FF-sEVs in oocyte maturation and blastocyst development.

Summary Sentence

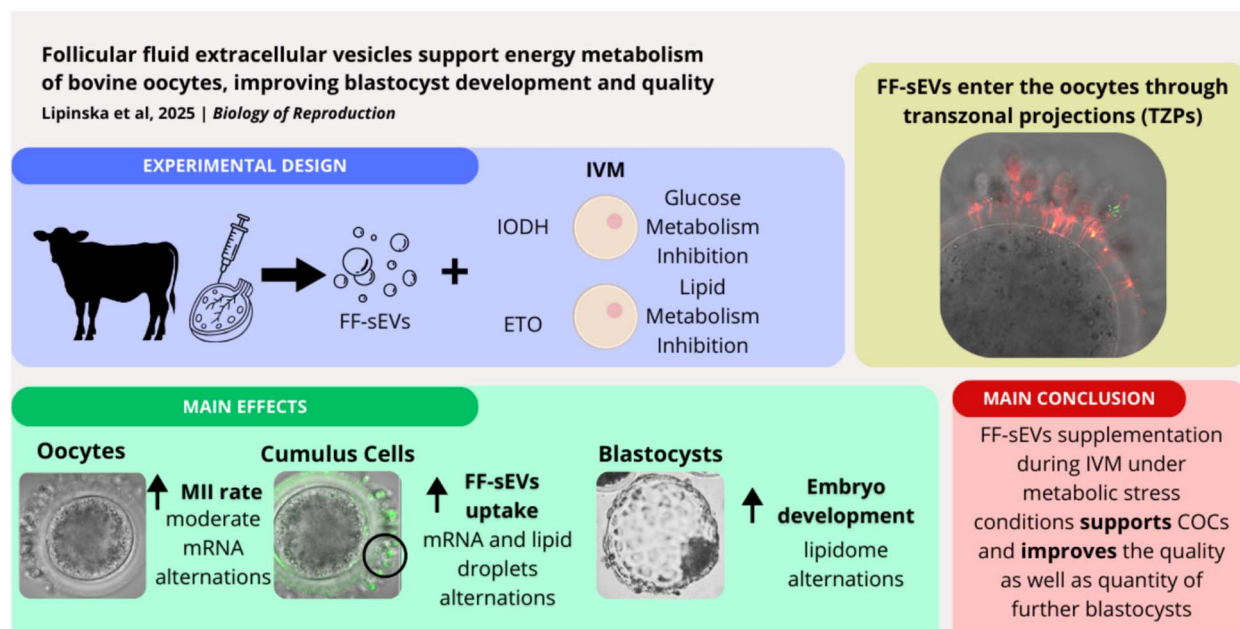
Follicular fluid sEV supplementation during IVM under metabolic stress conditions significantly affects COCs, with a positive effect on blastocyst quality, which provides novel insights into the role of EVs in oocyte and embryo development.

Received: January 29, 2025. Revised: March 24, 2025. Accepted: April 22, 2025

© The Author(s) 2025. Published by Oxford University Press behalf of Society for the Study of Reproduction.

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted reuse, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Graphical Abstract



Key words: extracellular vesicles, oocyte, embryo, energy metabolism.

Introduction

Over the past decades, significant progress in assisted reproductive technologies has been made not only to treat human infertility but also to support animal breeding and preserve genetic material from valuable animals and endangered species. However, in vitro embryo production still falls short of replicating natural conditions since the final outcome is not fully satisfactory. With regard to farm animal species, the average blastocyst rate is 30%–40% for cattle, 20%–40% for horses, and 30%–50% for pigs [1]. The suboptimal results are partly due to deficiencies of oocytes in vitro maturation (IVM) systems, which do not fully mimic in vivo follicular conditions. Oocyte quality, reflected by its intrinsic developmental potential, determines its ability to be fertilized and develop into a healthy embryo and offspring. Poor oocyte quality may lead to arrested embryo development [2], partially due to disturbances of key metabolic pathways. Well-balanced oocyte energy metabolism has a significant impact on oocytes as well as further embryo development [3].

Intercellular communication within the ovarian follicle is crucial for the development of the competent oocyte [4]. A well-organized follicular environment is based on close cooperation among oocyte, cumulus cells (CCs), and follicular fluid (FF) [5]. Follicular fluid is the natural medium where the oocyte grows and matures. Numerous biomolecules, such as metabolites, growth factors, hormones, and extracellular vesicles (EVs), are abundant in FF [6, 7]. These components play a crucial role in supporting oocyte maturation by facilitating the bidirectional communication between oocytes and somatic cells during follicle development [8]. Among the various factors involved in this phenomenon, EVs derived from FF (FF-EVs) have gained increasing scientific attention. Extracellular vesicles are groups of lipid bilayer nanoparticles, ranging in size from 50 to 300 nm, that are secreted by different cell types [9, 10]. These particles transfer specific cargo to

their target cells, where they impact paracrine signaling in healthy and pathological processes. Studies in humans, cattle, and horses demonstrated that FF-EVs affect the transcriptome and proteome of CCs and oocytes, as well as oocyte developmental potential [11–13]. It has been shown that FF-EV supplementation modulates CC expansion during IVM of bovine oocytes [14]. Moreover, the impact of FF-EVs on bovine oocytes maturing under unfavorable conditions such as heat shock, oxidative stress, or after vitrification-warming has been described, causing better oocyte resistance to applied stress factors [11, 15–18]. Overall, a beneficial impact of FF-EVs on the oocyte has been shown, but their specific role in oocyte metabolism remains to be determined.

There are two main metabolic sources of energy for cells—glucose and lipids. Oocytes demonstrate limited ability of glucose uptake, which results from the lack of expression of the high-affinity, insulin-regulated glucose transporter SLC2A4 (or GLUT4) [19]. Consequently, they depend on CCs, which absorb glucose from the environment, convert it into pyruvate and lactate, and pass these products on to the oocyte cytoplasm [20]. The metabolism of lipids, which is an alternative energy source, is carried out by β -oxidation in the mitochondria in both oocytes and CCs. Lipids can be supplied to the oocyte from internal storage within the cumulus–oocyte complex—COC (mainly from lipid droplets [LDs]) or from external energy sources—FF or IVM medium [21]. The cleavage-stage embryo uses pyruvate as a major energy source, whereas, after compaction, glucose consumption increases. However, embryos at different steps of development may also utilize fatty acids to produce energy [22]. It has been shown that disturbance of energy metabolic homeostasis causes significant changes in the oocyte competence and quality [3, 23]. The energy metabolism is controlled by specific genes, and several were selected for the present experiment. The fatty acid metabolism-related genes [Fatty

Acid Synthase (FASN), Peroxisome Proliferator-Activated Receptor α (PPARA), Perilipin 2 (PLIN2)] are involved in lipid synthesis, storage, and oxidation, which are essential for cellular energy homeostasis [24–26]. The glucose metabolism-related genes [Acetyl-CoA Carboxylase α (ACACA), Glucose Transporter 1 (GLUT1)] play crucial roles in glucose uptake and lipid biosynthesis, both fundamental for energy balance and metabolic activity [27, 28]. Additionally, GDF9 (Growth Differentiation Factor-9) is a marker of oocyte competence, reflecting the metabolic status and developmental potential of cells [29].

In the present study, we showed that FF-sEVs (small EVs of diameter < 200 nm) supplementation during IVM under metabolic stress conditions supports energy metabolism in COCs, improving further embryo development and quality. Moreover, for the first time, we revealed that FF-sEVs enter the oocyte via transzonal projections (TZPs) present in the zona pellucida.

Materials and methods

The study was conducted according to the Polish Act of the protection of animals used for educational or scientific purposes of 15 January 2015 and directive 2010/63/EU (Journal of Laws Dz.U. 2015 No. item 266) of the European Parliament of 22 September 2010 (2010/63/EU) on the protection of animals used for scientific objectives, so this study did not require the consent of the competent ethics committee for animal experiments. The biological material (bovine ovaries) was obtained from commercial slaughterhouses after routine slaughter. Ovaries were transported from the slaughterhouse within 2 h in a thermal bag at $\sim 30^{\circ}\text{C}$.

All relevant data of the experiments were submitted to the EV-TRACK knowledgebase (EV-TRACK ID: EV250005) [30].

Unless otherwise stated, all reagents were supplied by Merck Group.

Collection of follicular fluid

Bovine FF collection was carried out according to Azari-Dolatabad et al. [31]. Briefly, FF was collected from ovarian follicles (4–8 mm in diameter) in six replicates. Ovaries were washed three times with warm saline solution, sterilized with 90% ethanol, and then dried with clean towels. Six batches of FF were collected from a mix of Belgian Blue and Holstein cow ovaries on six different, random days. The specific breed proportion, origin, age, and metabolic status of the cows were not recorded. Ovaries were selected based on the following criteria at the individual ovary level: (1) absence of corpora lutea, (2) absence of follicles greater than 25 mm in diameter, and (3) normal morphological characteristics, such as absence of adhesions and scars. Follicular fluid was aspirated from follicles with a sterile syringe and 1.2 mm needle. Acquired samples (1 mL per replicate) were then centrifuged at 4°C , 2000 g for 10 min. The supernatant was filtered with a $0.22\ \mu\text{m}$ filter to remove cell debris from the fluid, which resulted in further isolation of small EVs (FF-sEVs) of diameter < 220 nm, and it was transferred into 2 mL cryovials and stored at -80°C [31].

Extracellular vesicle isolation

Extracellular vesicle isolation from FF was carried out as described [4]. In brief, iodixanol working solution was prepared by adding a solution buffer [60 mM Tris-HCl, 6 mM

EDTA, and 0.25 M sucrose (pH 7.4)] to a stock solution of OptiPrep Density Gradient Medium (Sigma-Aldrich). Then, the homogenization buffer [10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, and 0.25 M sucrose (pH 7.4)] was combined with iodixanol working solution to create gradients with 5%, 10%, 20%, and 40%. The gradient was created in a 16.8 mL open-top polyallomer tube (Beckman Coulter, Brea, CA, USA) by layering 4 mL of 40%, 4 mL of 20%, 4 mL of 10%, and 3.5 mL of 5% solutions on top of each other. One-milliliter FF samples were layered on top of prepared gradients. Then, samples were centrifuged at 4°C for 18 h at 100 000 g (SW 32.1 Ti rotor, Beckman Coulter, Brea, CA, USA). Gradient fractions of 1 mL were collected starting from the top of the gradient. Fractions 9 and 10, corresponding to a density of 1.087–1.109 g/mL, were pooled, diluted in phosphate buffered saline (PBS), and centrifuged for 3 h at 100 000 g and 4°C . Obtained pellets of FF-sEVs from each replicate were pooled and resuspended in PBS to a final concentration of 98.7 mg/mL, as measured by NanoDrop, and stored at -80°C . Subsequent characterization of the EVs was performed by Nanoparticle Tracking Analysis (NTA), transmission electron microscopy (TEM), and Western blotting (WB).

Nanoparticle tracking analysis

To assess the size and the concentration of small EVs isolated from FF, Nanoparticle Tracking Analysis (NTA) was conducted with a NanoSight LM10 microscope. Six batches of isolated FF-sEVs were mixed and diluted in PBS to achieve a particle concentration of about 1×10^8 – 1×10^9 particles/mL. Samples were briefly vortexed and injected into the measurement chamber. Three individual videos were recorded for the sample and analyzed by NTA (NTA 3.4—Sample Assistant Build 3.4.4—SA) with a cCMOS camera type, a Blue488 laser type, an FPS of 25.0, and 749 frames.

Transmission electron microscopy

Small EVs derived from FF underwent morphological identification through TEM as detailed previously [4, 32]. Briefly, each sample was placed on electron microscopy grids pre-coated with formvar/carbon support film (FCF200H-CU-TB; Aurion). The grids were then stained with 1% uranyl acetate (in double-distilled water) for 45 s. Electron microscopy (JEM 1400 plus, JEOL, Benelux; and Zeiss EM 109, Carl Zeiss) was used to examine the prepared grids. Images were captured using a Quemas charge-coupled device camera (Olympus Soft Imaging Solutions GMBH).

Western blotting

In order to confirm the presence of FF-sEVs in the samples, WB was conducted using markers specific to EVs: CD63, CD9, and TSG101 (EV-associated proteins). All samples of isolated FF-sEVs were first dissolved in a reducing buffer [0.005% bromophenol blue, 3% 2-mercaptoethanol, 9.2% SDS, 40% glycerol, and 0.5-M Tris-HCl (pH 6.8)] and heated for 5 min at 95°C . SDS polyacrylamide gel electrophoresis was used to separate proteins. Samples were transferred into nitrocellulose membranes that were subsequently blocked with 5% BSA + 0.5% Tween for 45 min at room temperature. Next, the membrane was exposed to CD63 (1:200 in 5% BSA + 0.5% Tween PBS, ab68418, Abcam), CD9 rabbit (1:1000 in 5% BSA + 0.5% Tween PBS, CST- D3H4P, Cell Signaling Technology), and TSG101 mouse (1:1000 in 5% BSA + 0.5% Tween PBS, sc-7964) primary antibodies at 4°C and incubated overnight. Next, membranes were washed with

0.5% Tween in PBS followed by incubation with specific secondary antibodies all conjugated with horseradish peroxidase—HRP [anti-mouse IgG (GE Healthcare UK), 1:3000 in 5% milk + 0.5% Tween PBS; anti-rabbit IgG (GE Healthcare UK), 1:4000 in 5% BSA + 0.5% Tween PBS]. After a final wash step, a chemiluminescence substrate (WesternBright Sirius, Advansta) was added to the membranes. Imaging was performed using Proxima 2850 Imager (IsoGen Life Sciences).

Collection of bovine cumulus–oocyte complexes

Ovaries were collected in the slaughterhouse and transported to the laboratory. Good-quality COCs with no cytoplasmic degradation and at least three to four layers of CCs closely attached to the zona pellucida were acquired through aspiration using a 1.2 mm needle and syringe from ovarian follicles of 4–8 mm diameter.

In vitro maturation

Cumulus–oocytes complexes (50–60 COCs per one drop) were matured in 500 μ L of TCM199 + Glutamax (Gibco, Thermo Fisher Scientific, MA, United States) medium supplemented with 6 mg/mL fafBSA (fatty acid-free bovine serum albumin), 0.25 mM Na pyruvate, $1 \times$ concentrated penicillin–streptomycin solution, 2 μ g/mL follicle stimulating hormone (FSH), and 1 μ g/mL β -estradiol for 22 h. The conditions were maintained at 39°C, 5% CO₂, and maximum humidity.

Besides the control group, two treatments were included to inhibit glucose or fatty acid metabolism. All three treatments were supplemented with FF-sEVs or not, resulting in a total of six experimental groups:

- 1) CON—un-supplemented control group with IVM in the basic medium;
- 2) IODH, where IVM medium was supplemented with two inhibitors of glucose metabolism [1.5 μ M iodoacetate (IO, inhibitor of glycolysis) diluted in water and 150 μ M dehydroepiandrosterone (DHEA, inhibitor of pentose phosphate pathway) diluted in DMSO (dimethyl sulfoxide)];
- 3) ETO, where IVM medium was supplemented with an inhibitor of fatty acid metabolism (150 μ M etomoxir diluted in DMSO);
- 4) CON+, where IVM medium was supplemented with 6.5 μ g/mL of FF-sEVs;
- 5) IODH+, where IVM medium was supplemented with IO and DHEA as well as 6.5 μ g/mL of FF-sEVs; and
- 6) ETO+, where IVM medium was supplemented with etomoxir as well as 6.5 μ g/mL of FF-sEVs.

The concentration of DMSO in the IVM medium was 0.1%. This concentration was previously shown not to affect further embryo development [33]. Follicular-fluid sEVs were supplemented in a volume of 10 μ L per IVM well (stock concentration—98.7 mg/mL). The concentration was calculated according to the previously published guidelines [34].

After maturation, COCs were either denuded and fixed for further procedures or fertilized.

In vitro fertilization and embryo culture

For in vitro fertilization (IVF), high-quality semen from two bulls was purchased from a commercial artificial insemination station. The motile fraction of sperm was isolated using the BoviPure System following the manufacturer's protocol (Nidacon, Mölndal, Sweden). Briefly, the thawed semen was centrifuged in two layers of 80% and 40% BoviPure solution at 300 g for 15 min, and the precipitate was subsequently

washed in BoviWash solution. The final semen concentration was determined under a microscope (Nikon YS2-T) using a Burkner Chamber (BRANDT), and gamete coinubation was carried out with a semen concentration of 1×10^6 /mL for 20 h. The in vitro fertilization medium [35] was supplemented with PHE (penicillamine, hypotaurine, epinephrine). Embryo culture was conducted in 40 μ L droplets of SOF + fafBSA medium [36] for 9 days in 5% CO₂ and 5% O₂ and in 39°C (25–30 embryos per drop). On the third day after fertilization, half of the drop volume was replaced with fresh medium. The cleavage rate (related to the number of oocytes) was evaluated on the third day, whereas the blastocyst rate (related to the number of oocytes) and hatching rate (related to the total number of all blastocysts) were evaluated on the eighth day post-insemination.

Lipid droplet staining, microscope analysis, and image analysis

In order to verify how FF-sEVs affect single-COC LD parameters, COCs were matured in 17 individual 20 μ L droplets under oil in each replicate [31]. After maturation, COCs were washed in 0.2% PVP/PBS, and then, CCs were separated from oocytes by pipetting. Oocytes (in 4-well Nunc plates) and CCs (pooled from 17 COCs in one 1.5 mL Eppendorf tube) were fixed in 500 μ L of 4% paraformaldehyde (PFA) and stored at 4°C for further analysis.

Oocytes were permeabilized in 0.2% Triton X-100 solution for 20 min at room temperature and washed in 0.2% PVP/PBS. Twenty micrograms per milliliter of BODIPY 493/503 fluorescent dye was used to stain LDs (Thermo Fisher Scientific, MA, USA). Incubation was performed in 500 μ L of the dye solution in PBS at room temperature for 1 h in the dark. Oocytes were washed three times in 0.2% PVP/PBS to eject excessive dye. The chromatin of the nucleus and the polar body were visualized by staining the oocytes with 0.5 μ g/mL 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI; Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA). Oocytes were mounted on a glass slide with a single concave (Comex, Wrocław, Poland), covered, and stored at 4°C.

Cumulus cells removed from COCs were centrifuged at 1000 g for 5 min, resuspended in fresh PBS, and distributed on adhesive slides (SuperFrost Menzel, ThermoFisher Scientific) using Cytospin 4 (ThermoFisher Scientific). Then, the same staining protocol as for oocytes was applied.

Oocytes and CCs were analyzed using a confocal microscope Zeiss LSM 880 using a 488 nm filter with band-pass 500–550 nm for BODIPY 493/503 (laser Argon2) and 420–480 nm for DAPI (laser Diode 405) with LD LCI Plan Apochromat 40 $\times$ /1.2 Imm Korr DIC 27 objective (Zeiss, Germany). Each analyzed cell was scanned with the starting point at the top of the cell and up to the equatorial section (for oocytes) and the bottom of the cell (CCs). The intervals were 6 μ m for oocytes and 2 μ m for CCs. The acquired images were subjected to lipid parameter analysis, including lipid content, LD number, LD size, and the percentage of area occupied by LDs, using ImageJ Fiji software version v1.53c (NIH, Bethesda, MD, United States). The lipid content of both oocytes and CCs was determined using the formula: “integrated density” value minus (“total cell area” value $\times$ “background fluorescence” value). The cell area was determined by outlining the shape of the cell under the transmitted light for each slide separately. The measurement was then

taken, and the data value was recorded in square centimeters. The remaining parameters (LD number, size, and area) were quantified through the “analyze particle” command, which identified and measured fluorescence signals above the photo background. The area occupied by LDs (%) was automatically calculated based on the fluorescence-to-non-fluorescence signal ratio. The “watershed” command was additionally employed to eliminate potential LD clusters generated by the Fiji software. For each parameter, the value of each slice was computed separately.

Real-time qPCR analysis

Each sample of CCs and oocytes originated from a group of 25 COCs that were in vitro matured together in one well. After 22 h of IVM, COCs were transferred into PVP/PBS and denuded by vigorous pipetting. Cumulus cells were transferred into Eppendorf tubes and centrifuged (1000 g × 5 min), the supernatant was removed, and cells were frozen at -196°C . Fully denuded oocytes were transferred into Eppendorf tubes and frozen at -196°C . Until the beginning of experiments, samples were stored at -80°C .

Total RNA was extracted from oocytes and CC samples using the High Pure miRNA Isolation Kit (Roche, Basel, Switzerland) according to the manufacturer's guidelines. RNA precipitation was carried out with NF Pellet Paint Co-Precipitant. For this, 1 μL of Pellet Paint, 10 μL of 3 M sodium acetate, and 200 μL of 96% ethanol were added to the RNA sample. After a 5-min incubation, the samples were centrifuged at 18 000 g for 10 min. The RNA pellet was washed and centrifuged in 75% and 96% ethanol and subsequently dried at 40°C . Finally, the RNA was resuspended in 8 μL of water and assessed for OD260/280 ratio values using Nanodrop 2000c (Thermo Fisher Scientific). Subsequently, reverse transcription was performed on the total isolated RNA utilizing the Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit (Roche, Warsaw, Poland) following the manufacturer's protocol. The resulting complementary DNA (cDNA) samples were diluted 1:1 in water and stored at -20°C until further analysis. The real-time qPCR analysis was conducted with the standard curve method. Initially, the product of each gene was obtained by PCR and separated on a 1.5% agarose gel. Subsequently, the PCR product was isolated and purified using the GeneJET Gel Extraction Kit (Molecular Biology, ThermoFisher Scientific). The DNA concentration was quantified using a Nanodrop 2000c (Thermo Fisher Scientific), and serial 10-fold dilutions of DNA with known concentrations (standards) were prepared. These standards were then applied in real-time qPCR reactions to generate the respective standard curves, facilitated by the LightCycler 480 II software (Roche). The reactions were run using the LightCycler 480 II system with LightCycler 480 Probes Master reagents (Roche). The 20 μL reaction mixture consisted of 10 μL LightCycler Master, 4 μL primers, 4 μL PCR-pure water, and 2 μL cDNA. The following reaction conditions were applied: denaturation at 95°C for 5 min; amplification (40 cycles) at 95°C for 10 s, 60°C for 10 s, and 72°C for 10 s; and final cooling at 40°C . Through this approach, the relative concentration of the messenger RNA (mRNA) of genes responsible for fatty acid metabolism (*FASN*, *PPARA*, *PLIN2*), glucose metabolism (*ACACA*, *GLUT1*), and COC quality (*GDF9*) was evaluated (the list of primers with details—[Supplementary file 1](#)). Each cDNA sample underwent analysis in two separate PCR runs, and the resulting average value was used to determine the relative

transcript abundance compared to the geometric mean of two reference genes [Glyceraldehyde 3-Phosphate Dehydrogenase (*GAPDH*)] and [Tyrosine 3-Monooxygenase/Tryptophan 5-Monooxygenase Activation Protein Zeta (*YWHAZ*)].

Blastocyst lipid profiling

After 9 days of embryo culture, only hatched blastocysts were selected for the lipidomics experiment. A total of six single blastocysts per group, derived from three independent replicates, were included in the analysis. Each blastocyst was washed individually in PBS, transferred into an Eppendorf tube in minimum liquid volume, and frozen at -196°C . Samples were further stored at -80°C .

For lipid extraction, the collected samples were thawed and mixed with 50 μL of ultrapure water and then vortexed to induce cell lysis. Subsequently, 90 μL of methanol [high performance liquid chromatography (HPLC) grade] and 50 μL of chloroform (HPLC grade) were added and thoroughly mixed by pipetting to ensure the formation of a single-phase solution, followed by a 15-min incubation at room temperature. After incubation, 50 μL of ultrapure water and 50 μL of chloroform were added and mixed by pipetting; then, the mixture was centrifuged for 5 min at 3000 g. The resulting non-polar and polar phases were carefully transferred to new tubes and dried using a speedvac evaporator for approximately 4 h at room temperature. The dried lipid extract was then stored in a -80°C freezer for further analysis and experimentation.

The lipid extracts were diluted into 30 μL of acetonitrile/methanol/ammonium acetate 300 nM at the proportion of 3:6.65:0.35 (v/v/v) to reach a final concentration of 10 mM of ammonium acetate. Using a micro-autosampler (G1377A), the diluted lipid extracts were flow-injected into a triple quadrupole mass spectrometer (QQQ 6410, Agilent Technologies) at 10 $\mu\text{L}/\text{min}$ using a collection of ion transitions previously reported to profile lipids present in bovine oocytes and embryos [37, 38]. The ion intensity of each ion transition (or multiple reaction monitoring) over time was obtained using in-house scripts, and, for each embryo, the list of detected lipids was generated. The maximum ion intensity of each ion transition was compared to the blank, and the lipids that did not present an ion intensity of at least 30% above the blank sample were considered noise and removed from the analysis. Obtained lipids were categorized into lipid classes, and the following analysis was performed in MetaboAnalyst 6.0 software: enrichment analysis, pathway analysis, and statistical analysis (fold change and principal component). Data were uploaded in a csv format and normalized by sum. The fold change threshold was set for 1.5.

Extracellular vesicle PKH67 labeling

The procedure was conducted according to the protocol of PKH67 Green Fluorescent Cell linker Kit for General Cell membrane Labeling. Prior to labeling, FF-sEVs were thawed, gently vortexed, and kept on ice. To 40 μL of isolated FF-sEVs (stock concentration—98.7 mg/mL), 125 μL of DILUENT C was added and mixed by pipetting. In a separate tube, 1 μL of PKH67 dye was mixed with 250 μL of DILUENT C. The mixture was added to the FF-sEV suspension, mixed by pipetting, and incubated at room temperature for 5 min. Two negative controls were tested: (1) by adding 25 μL of PBS to 250 μL of DILUENT C with PKH67 dye and (2) by adding 25 μL of FF-sEVs to 250 μL of DILUENT C without PKH67 dye. To stop the reaction, 250 μL of EV-free FBS (Gibco, ThermoFisher Scientific) was added and

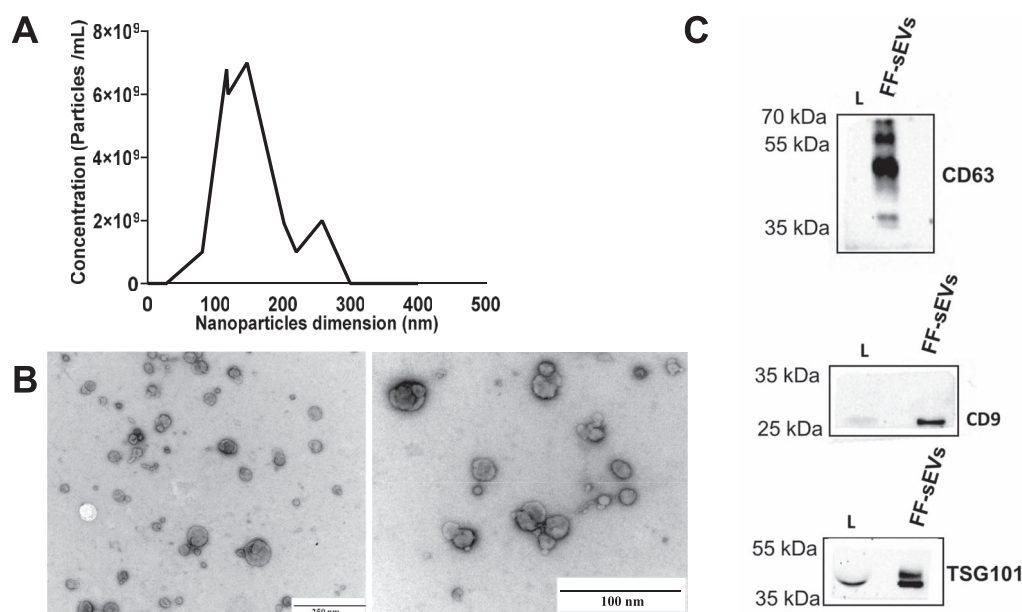


Figure 1. Characterization of sEVs isolated from bovine follicular fluid—concentration, morphological features, and surface markers. (A) Graph showing Nanoparticle Tracking Analysis (NTA) data of FF-sEVs concentration (particles/mL) and size distribution (nm) in pooled sample; (B) Transmission electron microscopy images of FF-sEV morphology (scale bar: 100 and 250 nm); and (C) Western blotting analysis detected the presence of extracellular vesicle-associated proteins: CD9 (25 kDa), CD63 (42 kDa), and TSG101 (42 kDa).

incubated for 1 min at room temperature. The mixture was then transferred to tubes designated for ultracentrifugation (Thermo 5.0 mL PA Thin-Walled Tube) and centrifuged at 100 000 *g* for 30 min at 4°C (Sorvall MX120+ Micro-Ultracentrifuge). After centrifugation, the pellet of each single sample was resuspended in 20 μ L of PBS.

Extracellular vesicle uptake analysis

Labeled FF-sEVs were added to 500 μ L of maturation medium in a volume of 20 μ L. After 22 h of IVM, oocytes treated with FF-sEVs were incompletely denuded (leaving one to two layers of *corona radiata* cells) and fixed in 2% PFA, whereas the remaining CCs were fixed in 4% PFA. To visualize TZPs, an additional 30-min incubation in 1 $\times$ phalloidin (iFluor 555 Reagent, Abcam, Cambridge, UK) was performed. Oocytes were mounted on a glass slide with a single concave (Comex, Wroclaw, Poland) with 70 μ L Antifade mounting medium (ThermoFisher Scientific), covered, and analyzed the following day. Cumulus cells were mounted on the cytospin slides, centrifuged in Cytospin 4 (ThermoFisher Scientific), stained with 15 μ L DAPI (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA), covered, and analyzed immediately.

The Zeiss LSM 880 confocal microscope was used to visualize the FF-sEV uptake. For FF-sEV labeling, the excitation wavelength was 488 nm and the emission 537 nm (laser Argon2). For DAPI staining (used only with regard to CCs), the excitation wavelength was 405 and the emission 438 nm (Laser Diode 405). For phalloidin staining, the excitation wavelength was 543 and the emission 575 nm.

Statistical analysis

The Wilcoxon test and Kruskal–Wallis test were applied to compare statistical significance. These analyses were conducted using the statistical software package R (<https://cran.r-project.org/>). Comparisons between groups in the uptake experiment were performed using the chi-square test.

Results

Characterization of follicular-fluid small extracellular vesicles

The NTA analysis revealed that the sizes of EV particles ranged between 30 and 450 nm (Figure 1A). The mean particle size was 166.2 ± 2 nm, with a mode of 133.5 ± 8.9 nm and a standard deviation of 68.1 ± 2.7 nm. The D50 value, representing the median particle size, was 146.6 ± 2.0 nm, while D10 and D90 values were 105.8 ± 1.5 and 257.7 ± 0.9 nm, respectively, indicating that 10% of the particles were smaller than 105.8 nm and 90% were below 257.7 nm. The concentration of nanoparticles in the sample was 1.34×10^{10} particles/mL. Additionally, TEM analysis revealed the presence of sEVs within a similar size range of NTA analysis (Figure 1B). Finally, WB confirmed the presence of proteins associated with EVs (CD63, CD9, and TSG101; Figure 1C).

Enhanced follicular-fluid small extracellular vesicle uptake by cumulus cells under metabolic inhibition

Two approaches were used to analyze the FF-sEV uptake in bovine COCs. For the analysis of FF-sEV uptake within cumulus–oocyte complexes, 10–15 partially denuded COCs from each group (CON+, IODH+, ETO+) were scanned in three replicates of each. Phalloidin staining allowed us to visualize FF-sEVs, which crossed the zona pellucida through TZPs (Figure 2). Follicular-fluid extracellular vesicle signals were also detected next to the oocyte surface within enlarged points of TZP–oocyte attachment (Figure 2D). The vesicles were further present in the perivitelline space (Figure 2E), and ooplasm (Figure 2F). Moreover, confocal microscopy images of oocytes revealed the presence of FF-sEVs both in oocytes and CCs in control as well as two experimental groups (Figure 3A).

For quantitative measurements of FF-sEV uptake in CCs, a total of 3797 cells were analyzed across three groups, with three replicates in each group: CON+ ($n = 1188$), ETO+ ($n = 1314$), and IODH+ ($n = 1295$). The analysis focused on

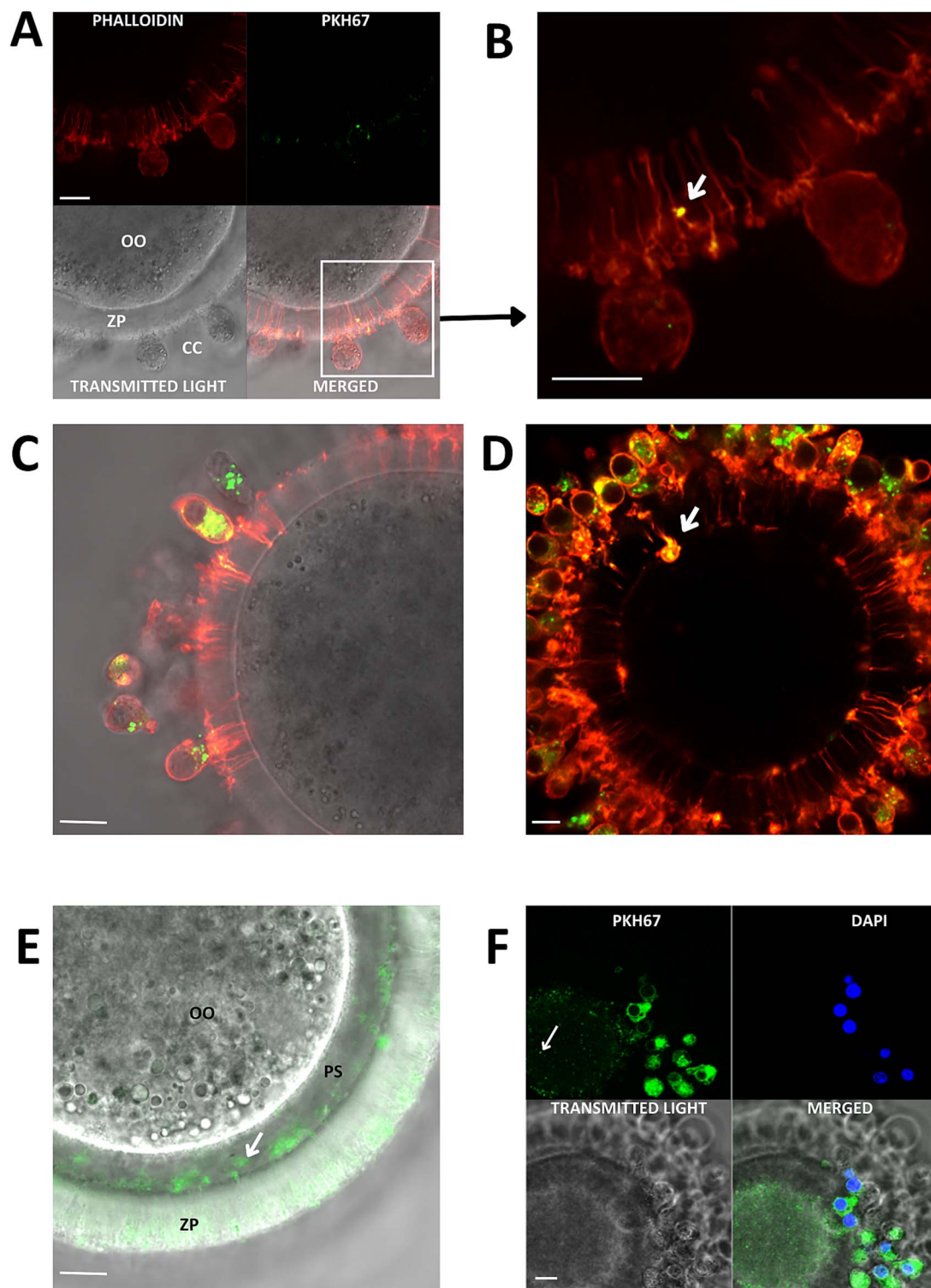


Figure 2. Double staining of transzonal projections (TZPs) using phalloidin (red fluorescence) and FF-sEVs labeled with PKH67 dye (green fluorescence). Signal overlap appears as a yellow color in the image. OO—oocyte, ZP—zona pellucida, CC—cumulus cells, PS—perivitelline space. Scale bar = 10 μm . All figures are representative confocal microscopy images of an oocyte with cumulus cells, with a special focus on: (A) TZPs within zona pellucida and FF-sEV signals; (B) enlarged fragment of zona pellucida with visible FF-sEVs entering the oocyte through TZPs; and (C) signals of FF-sEVs detected both in cumulus cells and within TZPs. (D) arrow indicating FF-sEVs signals next to the oocyte surface within enlarged points of TZP–oocyte attachment; (E) signals of FF-sEVs within perivitelline space indicated with an arrow; and (F) signals of FF-sEVs in the cytoplasm of the oocyte indicated with an arrow.

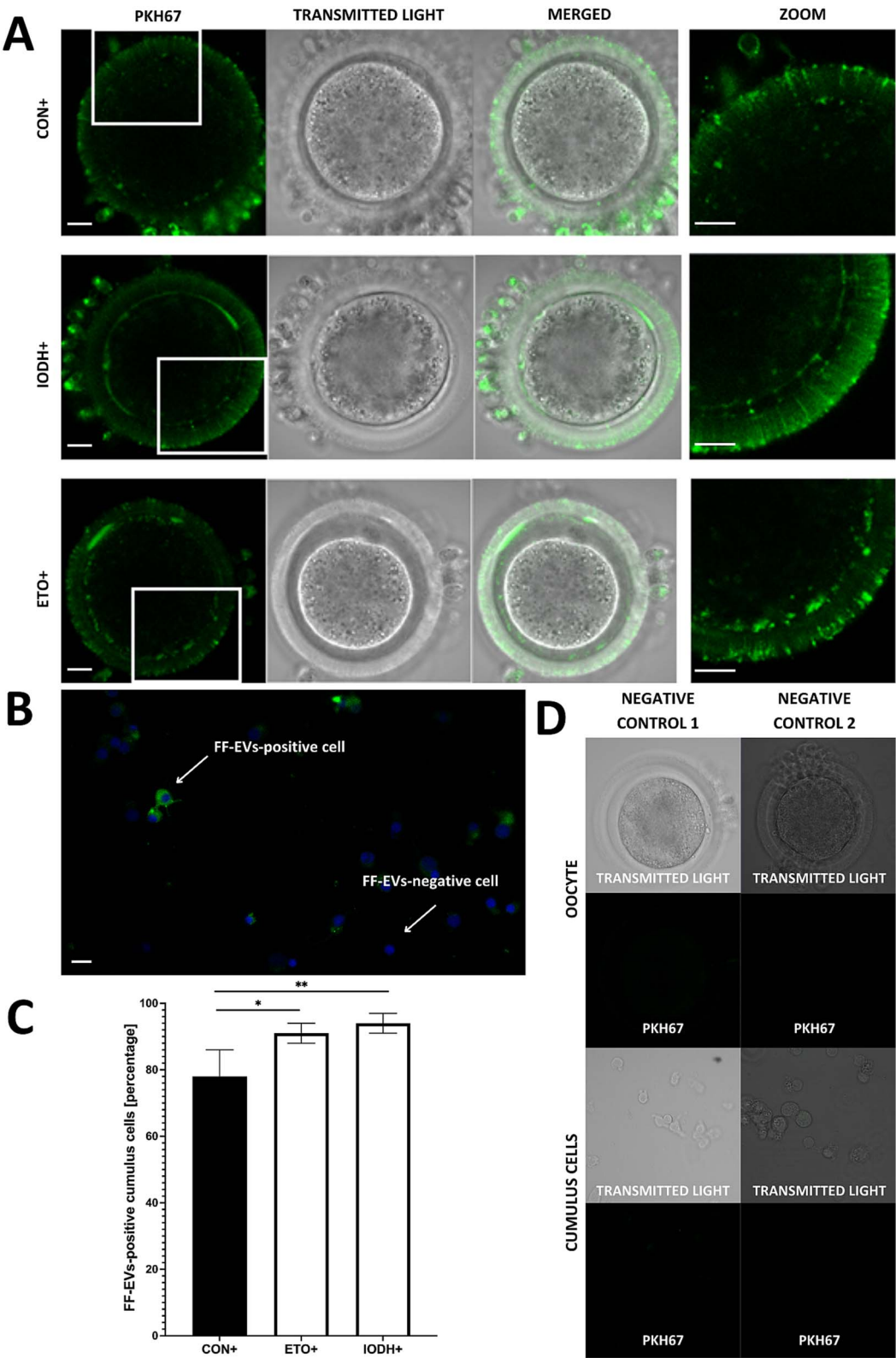


Figure 3. The effect of FF-sEV uptake after 22 h of COC maturation. Experimental groups: CON+ (control), IODH+ (maturation with glucose metabolism inhibitors), and ETO+ (maturation with a lipid metabolism inhibitor). Green fluorescence represents PKH67-labeled FF-sEVs, while blue fluorescence indicates DAPI-stained nuclei. Scale bar = 10 μ m. (A) Confocal images of oocytes of the three supplemented groups. (B) Confocal images of cumulus cells with or without internalized FF-sEVs. (C) Bar graph showing the percentage of FF-sEV-positive cumulus cells in the three analyzed groups (mean $\pm$ SD; * $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.01$); (D) Confocal images of oocytes and cumulus cells from two negative controls: (1) labeling procedure without FF-sEVs, (2) labeling procedure without PKH67 dye.

the ratio of EV-positive CCs (cells that accumulated FF-sEVs within the cytoplasm) in relation to the total number of cells evaluated (FF-sEV-positive and negative cells visualized in Figure 3B). Both in IODH+ ($94\% \pm 3$, $P \leq 0.01$) and ETO+ ($92\% \pm 3$, $P \leq 0.05$), significantly more CCs accumulated FF-sEVs when compared to the control ($79\% \pm 7$, Figure 3C).

Follicular-fluid small extracellular vesicles enhance oocyte maturation and blastocyst hatching in inhibited metabolism conditions

The in vitro production experiments were based on a specific number of experimental replicates per group (CON – 10, CON+ – 6, IODH – 11, IODH+ – 5, ETO – 7, ETO+ – 5). Follicular-fluid sEV supplementation had no significant impact on metaphase II (MII) rate in the control conditions (76% and 72%, CON+ vs CON, respectively). However, supplementation of maturation media with FF-sEVs along with lipid or glucose metabolism inhibitors significantly increased the MII rate in both experimental groups: from 48% to 83% in IODH+ ($P < 0.01$) and from 53% to 70% in ETO+ ($P < 0.05$) when compared to their controls (IODH and ETO, respectively) (Figure 4).

There were no significant differences in the cleavage rate across treatment groups. Regarding the blastocyst rate calculated relative to the total number of immature oocytes, only the IODH+ group showed a statistically significant increase ($P < 0.01$) when compared to the non-supplemented group (22% and 9% blastocyst rate, respectively). Significant differences were observed in the hatched blastocyst rates among all supplemented vs non-supplemented groups. The CON+, IODH+, and ETO+ groups showed increases of 24% ($P < 0.01$), 17% ($P < 0.01$) and 10% ($P < 0.05$) (Figure 4).

Follicular-fluid small extracellular vesicles modulate lipid droplets in cumulus cells and oocytes

Lipid droplets were analyzed in 366 CCs (CON $n = 60$; CON+ $n = 60$; IODH $n = 63$; IODH+ $n = 60$; ETO $n = 61$; ETO+ $n = 62$) and 243 oocytes (CON $n = 38$; CON+ $n = 39$; IODH $n = 48$; IODH+ $n = 40$; ETO $n = 38$; ETO+ $n = 40$) in four replicates. Four LD parameters were assessed: lipid content, LD size, number of LDs, and LD area (Figure 5).

In CCs, comparing the CON+ with the CON group, the supplementation of FF-sEVs increased lipid content and LD number and also decreased LD size. In the IODH group, FF-sEV supplementation led to a decrease in lipid content and an increase in LD number and LD area, with no alterations in LD size. In the ETO group, FF-sEV supplementation increased lipid content and LD area, with no changes in LD number or size.

In oocytes, no differences were detected between the CON+ and CON groups across any of the analyzed parameters. Comparing IODH+ versus IODH conditions, observations revealed a decrease in lipid content after FF-sEV supplementation. Similarly, in the comparison between ETO+ and ETO, LD size showed a notable decrease upon supplementation.

Follicular-fluid small extracellular vesicle supplementation affects relative transcript levels of energy metabolism-related genes both in oocytes and cumulus cells

Relative transcript levels for selected genes involved in energy metabolism were analyzed in 36 samples of CCs (six replicates

per group; Figure 6) and 36 samples of oocytes (six replicates per group; Figure 7).

In CCs, CON+ showed significant upregulation of *GLUT1* and *ACACA* ($P < 0.01$) mRNA levels. During maturation with glucose metabolism inhibitors, supplementation with FF-sEVs resulted in downregulation of *ACACA* ($P < 0.05$) and *PPARA* ($P < 0.05$) mRNA levels. When fatty acid metabolism inhibition was applied, the sole significant observation was an upregulation of *ACACA* in ETO+ vs ETO ($P < 0.05$).

In the oocytes, the CON+ group presented decreased mRNA levels of *GLUT1*, *ACACA*, and *PLIN2* ($P < 0.01$), with *GDF9* remaining unaffected. A decrease of *ACACA* and *PLIN2* mRNA levels in IODH+ vs IODH was observed. In ETO+ vs ETO, a significant decrease in *GDF9* expression was observed. The absence of *FASN* and *PPARA* in this analysis is due to their mRNA concentrations being below the threshold of reliable detection, falling within a range that approaches the limit of assay sensitivity.

Follicular-fluid small extracellular vesicle supplementation during in vitro maturation alters lipid profiles and metabolic pathways in blastocysts

The lipidomic analyses were conducted on blastocysts originating from oocytes matured in the experimental groups—both supplemented with FF-sEVs (IODH+, $n = 6$; ETO+, $n = 6$) and non-supplemented (IODH, $n = 6$; ETO, $n = 6$). The analysis resulted in the identification of a total of 207 distinct lipid species classified in nine subclasses (the number of lipid species within each lipid subclass is shown in the brackets): PC—phosphatidylcholine (52), PE—phosphatidylethanolamine (48), TGs—triglycerides (42), acyl-carnitines (19), PS—phosphatidylserine (15), PG—phosphatidylglycerol (11), SM—sphingomyelin (7), PI—phosphatidylinositol (7), CE—cholesterol esters (6). Three of the most abundant lipid classes in the analyzed blastocysts were PC, PE, and triacylglycerols.

Using MetaboAnalyst 6.0 software, IODH+ vs IODH and ETO+ vs ETO were compared. Specifically, fold change analysis, enrichment analysis, and principal component analysis (PCA) were performed to detect differential lipid profiles and potential metabolic pathways affected in these experimental conditions.

To evaluate the impact of FF-sEV supplementation on the blastocyst lipidome in IODH+ vs IODH groups, statistical and enrichment analyses were conducted. Specifically, 22 lipid species were found to be downregulated, while 2 lipid species were upregulated in the IODH+ group when compared to the IODH group (Supplementary file 2). Among the downregulated lipid species, the most abundant subclass was acyl-carnitines, with 15 members exhibiting decreased concentration levels. Additionally, four TGs, three PCs, and one PE were also found to be significantly changed (Figure 8A). Upregulated lipids belonged to PEs (1) and acyl-carnitines (1). The PCA was conducted specifically on the acyl-carnitines group, which exhibited the most significant changes. The results revealed 74.6% of the diversity within this subclass. The enrichment analysis pointed out that the two pathways' activities significantly changed: phospholipid biosynthesis and arachidonic acid metabolism.

In the comparison of ETO+ and ETO conditions on blastocyst lipidome (Figure 8C), a total of 65 lipid species (Supplementary file 3) were found to be significantly

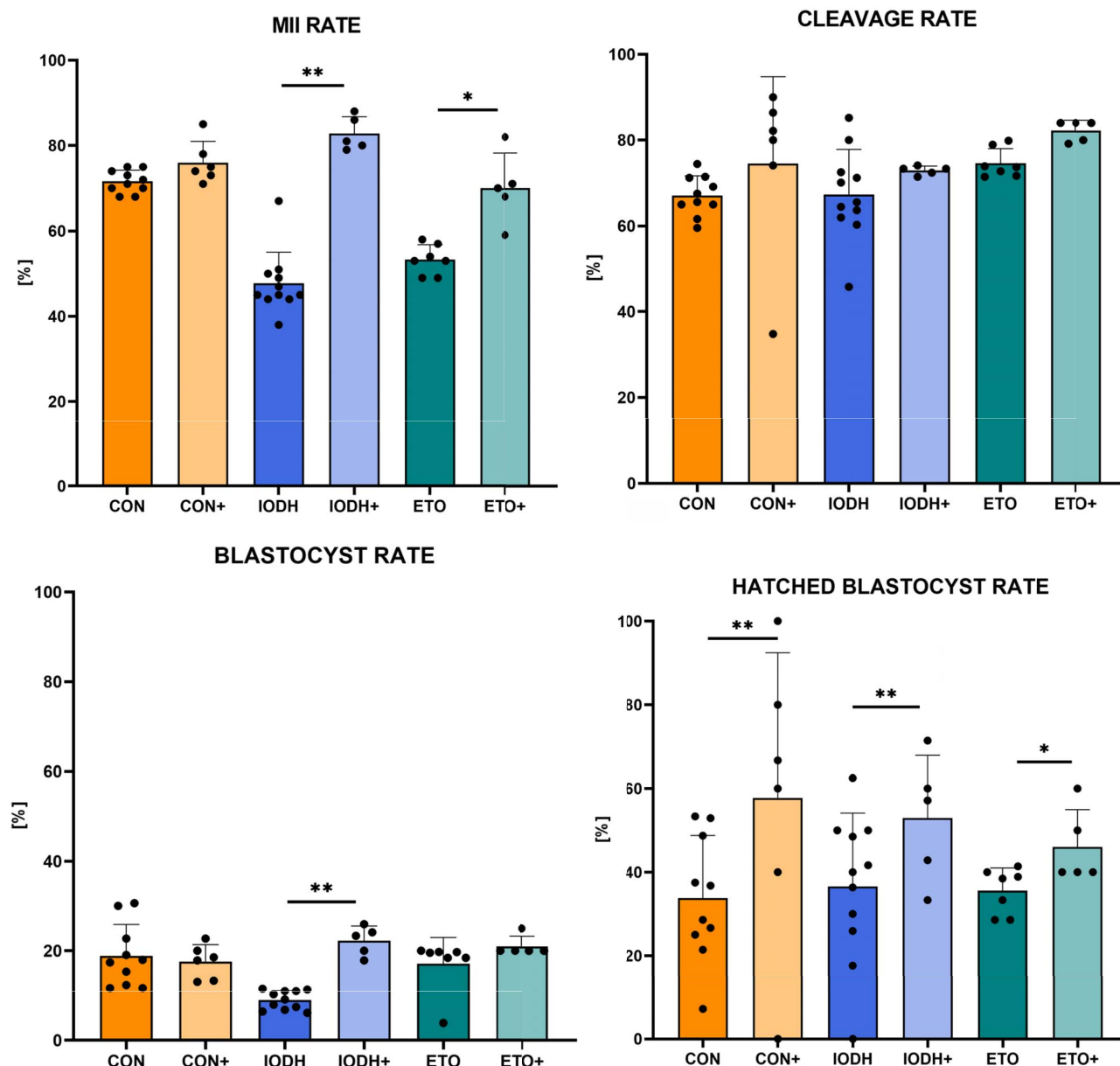


Figure 4. The effect of FF-sEV supplementation on the in vitro production outcome. The metaphase II (MII), cleavage, blastocyst, and hatched blastocyst rates [%], compared between supplemented and non-supplemented groups (means $\pm$ SD). Metaphase II, cleavage, and blastocyst rates are related to the number of immature oocytes, whereas the hatched blastocyst rate is related to the number of all blastocysts. * $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.01$.

upregulated. Among these upregulated lipid species, PCs were the most prominent group, with 19 members showing increased content. Additionally, PEs exhibited significant upregulation, with 13 members showing increased content. The PCA was conducted separately for the PE and PC lipid subclasses. The outcome showed 64.4% and 96.6% of the diversity within these classes, respectively. The pathway analysis identified significant enrichment of phospholipid biosynthesis and arachidonic acid metabolism, in conformity with the results observed for IODH+.

Discussion

The fundamental element of the present experiment was a proper isolation of FF-derived small EVs and verification of their quality as well as quantity. The characterization of

FF-sEVs isolated for this research was performed according to guidelines proposed in Minimal information for studies of extracellular vesicles (MISEV) 2023 [39]. The NTA and TEM analyses identified FF-sEVs with a mean size of 166.2 ± 2.0 nm and a mean concentration of 1.34×10^{10} particles/mL. These findings are consistent with previous studies in bovine [14, 40], humans [41], buffalo [42], and equine [43].

Confocal imaging shows that FF-sEVs are initially incorporated by CCs and subsequently transferred to the oocyte. Our findings are in accordance with a previous study in cattle, in which fluorescently labeled EVs were noticed in CCs and inside the zona pellucida [11]. However, in the current study, we demonstrate for the first time that FF-sEVs are present within TZPs. For TZP visualization, staining of phalloidin was applied, which is a cyclic heptapeptide that binds to filamentous (F)-actin, an element of TZPs [44].

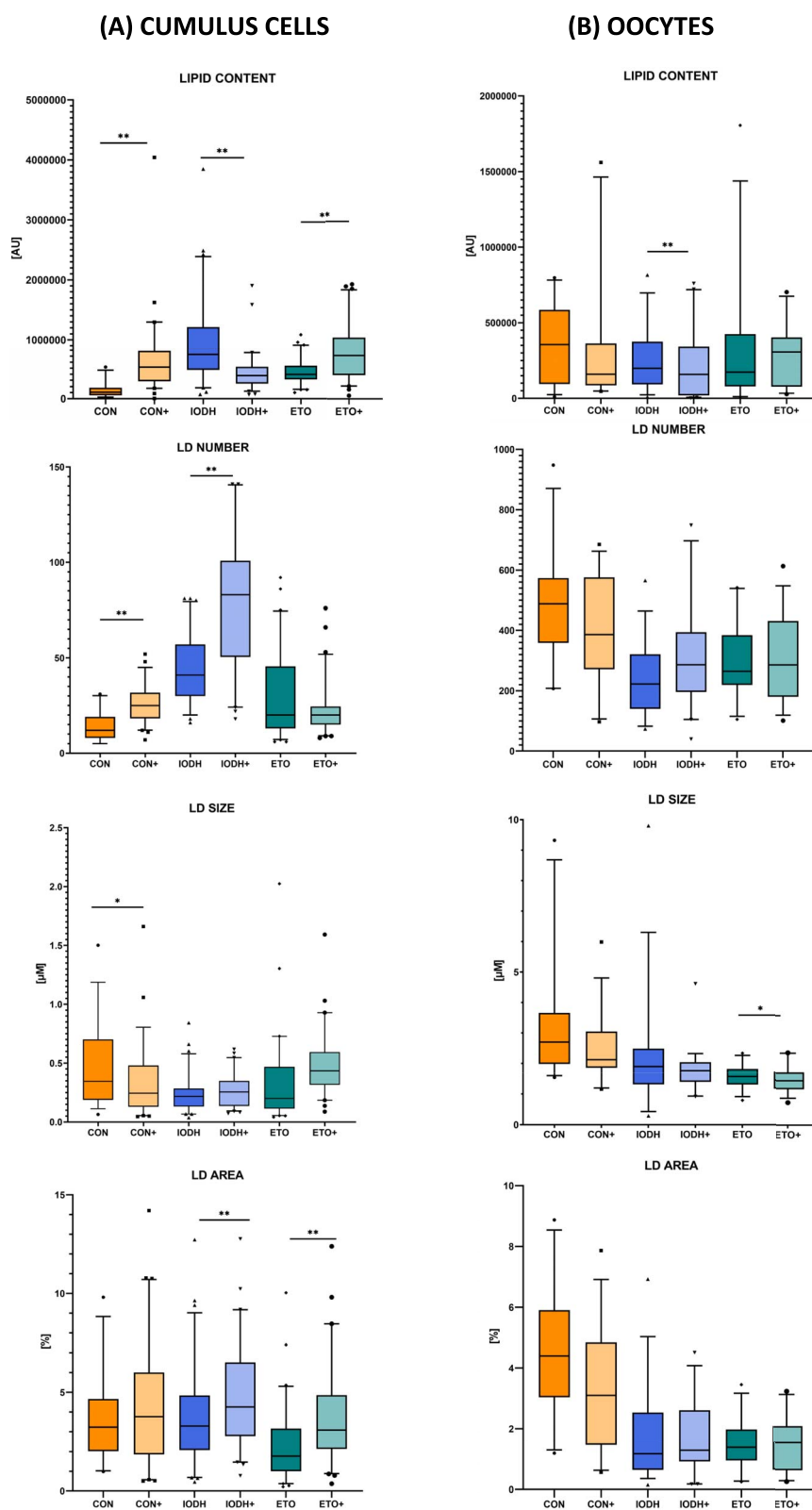


Figure 5. Lipid droplet parameters in oocytes and cumulus cells. The comparison is revealed between supplemented and non-supplemented groups (CON+ vs CON, IODH+ vs IODH, ETO+ vs ETO) for cumulus cells (A, diagrams in left column) and oocytes (B, diagrams in right column); * $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.01$.

On the images obtained from the confocal microscopy, we demonstrate signals of FF-sEVs detected within TZPs passing through the zona pellucida (Figure 2A and B). We also detect

FF-sEV signals next to the oocyte surface within enlarged points of TZP–oocyte attachment (Figure 2C), which were described as a common extension of TZPs toward the oocyte

CUMULUS CELLS

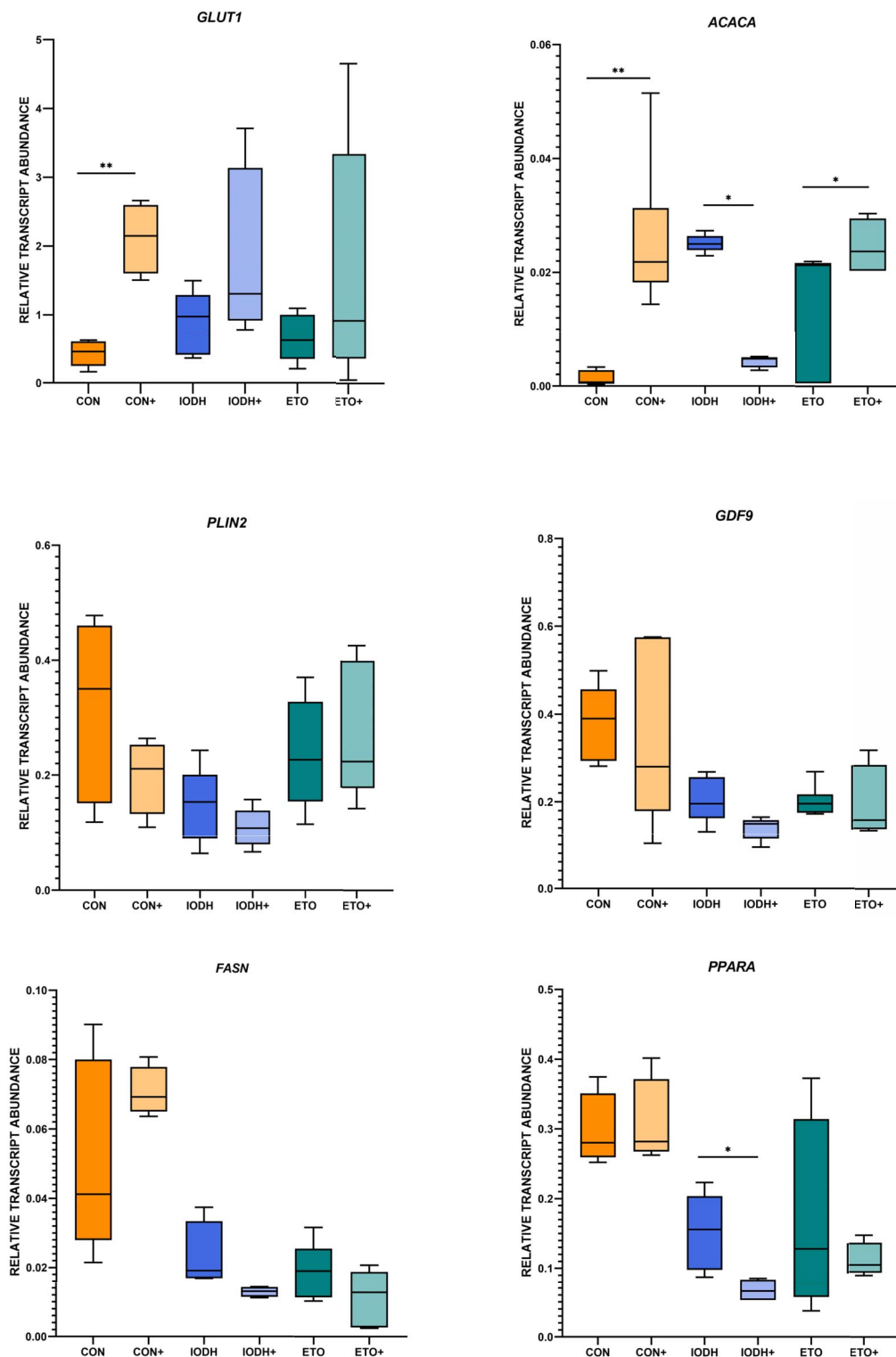


Figure 6. The effect of FF-sEV supplementation on the relative mRNA level of selected genes in cumulus cells. The comparison is revealed between supplemented compared to non-supplemented groups (CON+ vs CON, IODH+ vs IODH, ETO+ vs ETO). The results are shown as a transcript abundance of the gene of interest related to the geometric mean of reference genes. * $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.01$.

OOCYTES

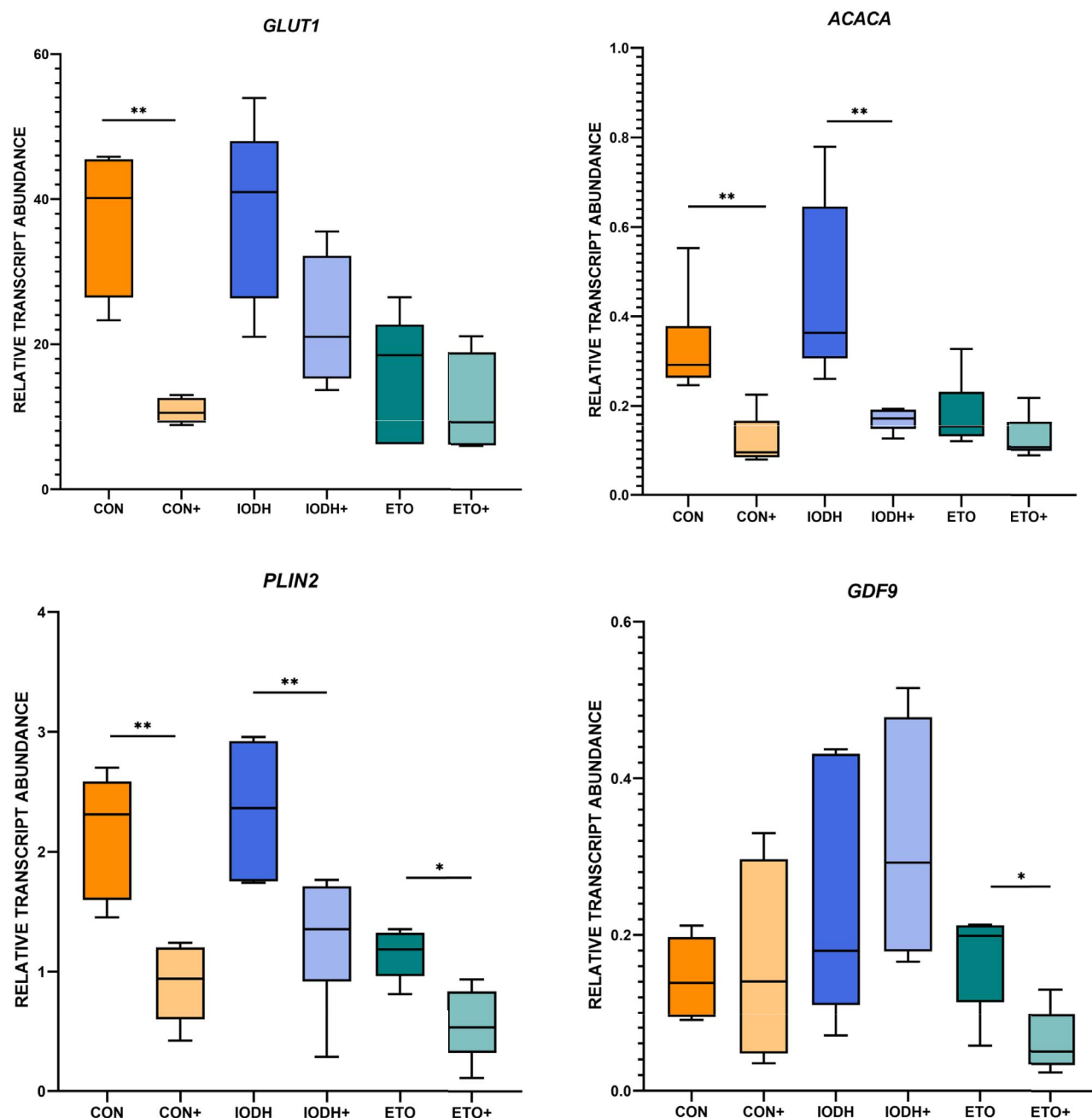


Figure 7. The effect of FF-sEV supplementation on the relative mRNA level of selected genes in oocytes. The comparison is revealed between supplemented compared to non-supplemented groups (CON+ vs CON, IODH+ vs IODH, ETO+ vs ETO). The results are shown as a transcript abundance of the gene of interest related to the geometric mean of reference genes. * $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.01$.

[44]. Further, we also detect FF-sEV signals in the perivitelline space (Figure 2D) and in the oocyte cytoplasm (Figure 2E). PKH67, which is a dye used in the present experiment for FF-sEV labeling, is a highly fluorescent, lipophilic, long-chain carbocyanine dye used to stain EV membranes [45]. Obtained images indicate that FF-sEV structures detected and visualized in the present study are intact and are transported from maturation medium to the oocyte via TZPs.

Further, we demonstrated that CCs within COCs exhibit significantly higher uptake of FF-sEVs under induced metabolic stress when compared to the control group. This increased uptake is observed both under conditions of glucose metabolism inhibition and fatty acid metabolism inhibition. It has been previously described that cells release EVs in response to stress stimuli in order to spread signaling molecules or to remove waste material [46]. Furthermore,

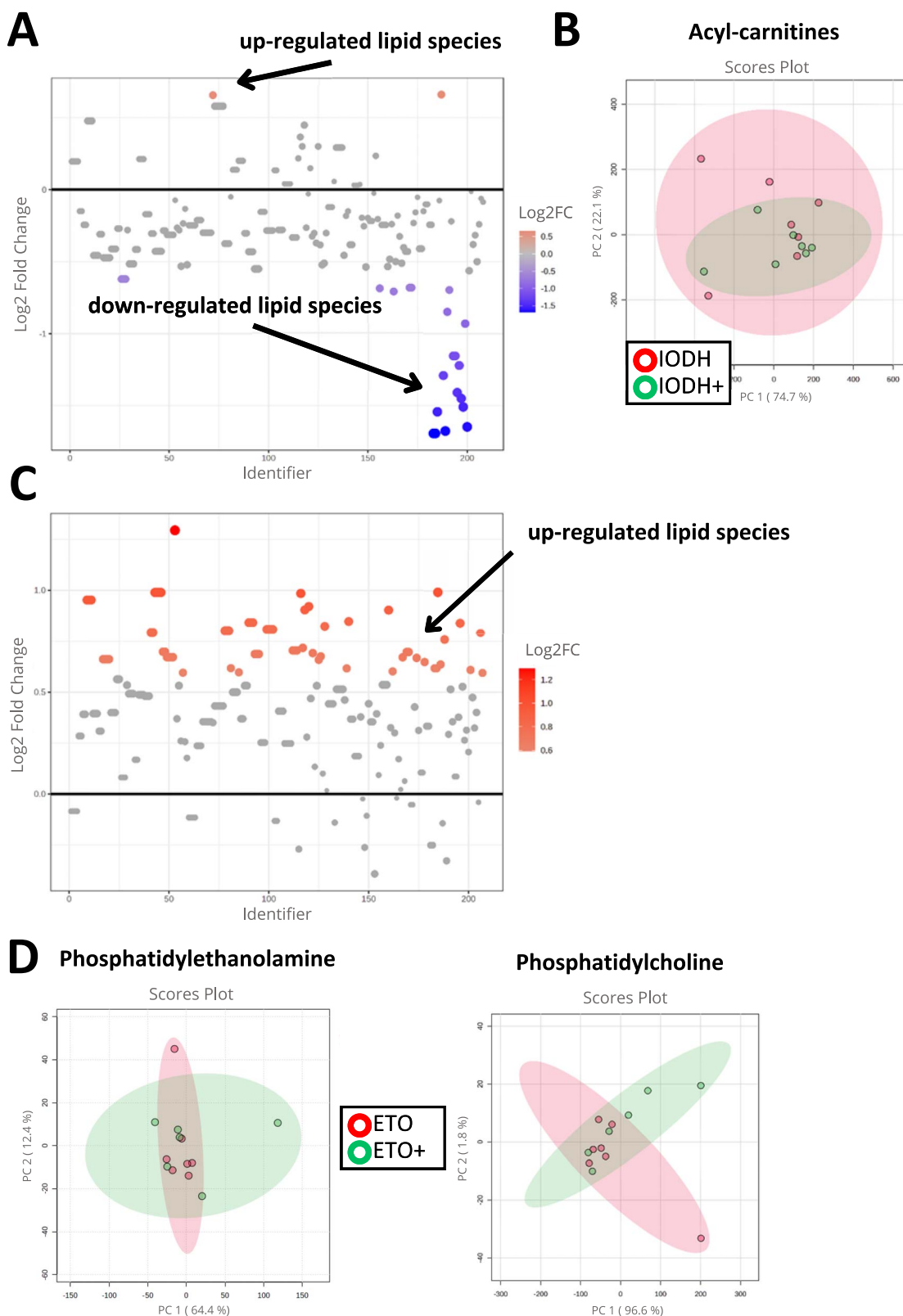


Figure 8. Lipidomics response of the blastocysts on FF-sEV supplementation during IVM originated from oocytes matured in medium supplemented with inhibitors of glucose metabolism (A and B) or inhibitors of lipid metabolism (B and C). (A, C) Fold change analysis graphs of detected lipids; (B, D) Score plot analysis of lipid groups that were the most numerous groups of lipids significantly highlighted in the fold change analysis.

the content of EVs varies in response to stress factors (e.g., oxidative stress), subsequently influencing the recipient cells' ability to withstand unfavorable conditions and maintain viability [47]. To the best of our knowledge, we demonstrate for the first time an increase in FF-sEV uptake by CCs as a response to metabolic stress conditions during IVM, suggesting that FF-sEVs may support the counteraction of the negative effects of the environment.

The CC layer acts as a molecular filter, selecting specific types and amounts of small metabolites to be transported to the oocyte [48], which may have a beneficial effect. Follicular-fluid EVs are probably involved in this mechanism, as they have been shown to influence the viability, expansion, and gene expression (transcriptome) of equine CCs [49]. This hypothesis is supported by the present study, where FF-sEV supplementation during metabolic stress conditions significantly changes relative transcript levels of lipid metabolism-related genes along with LD parameters in CCs. Changes in gene expression and lipid composition in response to metabolic stress after FF-sEVs supplementation were more pronounced in CCs than in oocytes. The most significant alterations occurred when glucose metabolism was inhibited, since FF-sEV supplementation reduced the transcript levels of *ACACA* and *PPARA* genes in CCs. Additionally, a decreased total lipid content was observed, suggesting that FF-sEVs supplementation may enhance the utilization of LDs for energy production to compensate for the reduced glycolysis. The decreased *ACACA* transcript level may be a consequence of this mechanism, as this gene encodes a key enzyme involved in the biosynthesis of long-chain fatty acids [50], a process typically activated mainly when excess energy is available. Furthermore, the downregulation of the *PPARA* gene in CCs following FF-sEV supplementation suggests a reduction in fatty acid uptake, which may also limit the accumulation of external energy reserves in LDs. In our opinion obtained results suggest that FF-EV supplementation enhances the production of energy from lipid sources under glucose metabolism disturbances in CCs. In contrast to CCs, there were almost no changes observed in LD parameters in oocytes when supplemented vs non-supplemented groups were compared. Surprisingly, with regard to gene expression results, most of the analyzed genes were down-regulated in at least one of the FF-sEV-supplemented groups; however, no clear pattern of response was observed. In our opinion, the observed outcomes highlight the complexity of the process involved, suggesting that further studies are needed to achieve a more comprehensive understanding of the EVs' role in COC metabolism.

Analyzing the obtained results in the context of oocyte quality, it is clearly demonstrated that supplementation with FF-sEVs during IVM has a significant impact on maturing oocytes. Under metabolic stress, FF-EV supplementation resulted in significantly higher MII rates. This is in conformity with previous studies where FF-EV supplementation supported equine oocyte maturation [43] and enhanced meiotic resumption after vitrification of feline COCs [17]. Proteomic analysis of feline FF-sEVs identifies 674 proteins involved in the regulation of many pathways, including oxidative phosphorylation, extracellular matrix formation, oocyte meiosis, cholesterol metabolism, glycolysis/gluconeogenesis, MAPK, PI3K-AKT, HIPPO, and calcium signaling pathways [17]. It may be therefore suggested that an increased uptake of FF-sEVs in response to metabolic stress in the present study

could support better meiosis progression and improved COC quality, acting within these pathways.

We recently demonstrated that supplementation of IVM medium with selected microRNA identified in FF-EVs significantly improved blastocyst quality with a higher total cell number and inner cell mass number [51]. In the current study, FF-sEV supplementation during IVM improved both development rates as well as embryo quality. The blastocyst rate was significantly improved in the IODH+ group, whereas the hatching rate was enhanced across all supplemented groups vs their non-supplemented controls (Figure 3). Our previous experiments have already revealed that the oocyte maturation environment not only affects the oocytes and CCs' metabolism [23] but also exerts a substantial effect on preimplantation development programming at cellular and molecular levels [52]. We showed that inhibition of glucose and fatty acid metabolism led to cellular stress response, compromising the quality of preimplantation embryos [52]. Since previously published results showed limited embryo development when glucose metabolism was inhibited during the IVM stage [22], the present results indicate that FF-sEV supplementation not only supports the maturation process but also enhances oocyte and embryo developmental competence. Changes observed in blastocysts in the present study, including the hatching rate, are a biologically plausible outcome consistent with findings reported in other studies [32]. These conclusions are further supported by the results of our lipidomic study.

The lipidome pathway enrichment analysis revealed that the same two metabolic pathways are up-regulated by FF-sEVs supplementation in both inhibition systems: phospholipid biosynthesis and arachidonic acid metabolism. These pathways are integral to the structure and functionality of cellular membranes [53–55]. Furthermore, they are involved in various biological processes, such as cellular defense, repair, and inflammation (through arachidonic acid) [56]. Consequently, it can be inferred that FF-sEVs uptake during IVM support the proliferation of further blastocysts by promoting cell division, which aligns with our previous study showing lower blastomere numbers within the trophectoderm in IODH and ETO blastocysts [52]. By modulating the arachidonic acid metabolism pathway, FF-sEVs may enhance implantation during further embryo development. This hypothesis is supported by the increased hatching rate observed in all FF-sEV-supplemented groups.

Lipidomic analysis under metabolic stress identified acyl-carnitines as the most abundant class of lipids, with significantly decreased concentrations of these lipid species in IODH+ blastocysts. Acyl-carnitines play an essential regulatory role in the balance between intracellular sugar and lipid metabolism by serving as carriers to transport activated long-chain fatty acids into mitochondria for β -oxidation [57]. Therefore, downregulation of acyl-carnitines within the blastocyst cells may affect overall metabolic homeostasis toward excessive accumulation of lipids.

In response to lipid metabolism inhibition, two lipid subclasses were identified as being the most significantly upregulated in ETO+ blastocysts: PC and PE. These phospholipids are among the most abundant components of mammalian cell membranes, sharing critical roles as structural elements, participants in lipid metabolism and signaling pathways, contributors to membrane trafficking and autophagy, and mediators of protein interactions [58, 59]. The increased

concentration of these lipids likely supports the maintenance of a balanced lipid composition in cell membranes, which is essential for optimal membrane dynamics, signaling, and metabolic functions. Furthermore, the elevated levels of PC and PE may enhance the cell's ability to manage stress conditions through improved autophagy, potentially leading to increased cell survival and functionality under adverse conditions. These outcomes indicate that FF-EV supplementation during IVM results in blastocysts with a greater ability to withstand metabolic stress and may promote cell divisions. This is further supported by a higher hatching rate in ETO+ blastocysts in this study.

Conclusions

Our study provides novel insights into the role of FF-sEVs in oocyte maturation and blastocyst development. We demonstrate that FF-sEVs are transported from the culture medium into CCs and through TZPs into the perivitelline space and ooplasm, revealing EV-mediated communication within the maturation environment. We show for the first time that CCs exhibit an increased uptake of FF-sEVs from the maturation medium under metabolic stress conditions. Furthermore, FF-sEV supplementation during stress conditions enhances the MII rate in oocytes and positively affects subsequent embryo quality, as evidenced by improved hatching rates and favorable lipidomic alterations in blastocysts. Lipid droplet parameters and gene expression in both CCs and oocytes matured under metabolic stress conditions are affected by FF-sEV supplementation. These effects are more pronounced in CCs, suggesting that FF-sEVs play a supportive role in determining oocyte quality by acting through CCs. Overall, FF-sEV supplementation during IVM under metabolic stress conditions has a positive impact on the COCs and blastocysts. In the future, obtained results may help to optimize the maturation conditions of oocytes collected from females burdened with severe metabolic disorders like obesity or diabetes.

Acknowledgment

Lipid profiling data have been acquired at the Metabolite Profiling Facility at Purdue University by CF. The authors acknowledge Ewa Sell-Kubiak for statistical analysis guidelines, Joanna Lechtanska for laboratory supervision, Centre of Experimental Medicine (Poznan University of Medical Sciences) for providing the ultracentrifuge, and Nima Azari Dolatabad for the individual culture advice.

Author contributions

PL—funding acquisition, laboratory analysis, statistical analysis, visualization of the results, and contribution in writing. KS—contribution in writing. AVS—supervision, contribution in writing. KCP—laboratory analysis, supervision, contribution in writing. EW—funding acquisition, conceptualization, supervision, laboratory analysis, main contribution in writing. All authors read and approved the final manuscript.

Conflict of Interest: The authors have declared that no conflict of interest exists.

Data availability

The data underlying this article will be shared on reasonable request to the corresponding author.

References

1. Niemann H, Wrenzycki C. *Animal biotechnology 1*. Switzerland: Reproductive biotechnologies Springer International Publishing; 2018.
2. Maloney CA, Rees WD. Gene-nutrient interactions during fetal development. *Reproduction* 2005; 130:401–410.
3. Warzych E, Lipinska P. Energy metabolism of follicular environment during oocyte growth and maturation. *J Reprod Dev* 2020; 66:1–7.
4. Asaadi A, Dolatabad NA, Atashi H, Raes A, Van Damme P, Hoelker M, Hendrix A, Pascottini OB, Van Soom A, Kafi M, Pavani KC. Extracellular vesicles from follicular and Antral fluid isolated by density gradient ultracentrifugation improve bovine embryo development and quality. *Int J Mol Sci* 2021; 22:578.
5. Dumesic DA, Meldrum DR, Katz-Jaffe MG, Krisner RL, Schoolcraft WB. Oocyte environment: follicular fluid and cumulus cells are critical for oocyte health. *Fertil Steril* 2015; 103:303–316.
6. Yang J, Li Y, Li S, Zhang Y, Feng R, Huang R, Chen M, Qian Y. Metabolic signatures in human follicular fluid identify lysophosphatidylcholine as a predictor of follicular development. *Commun Biol* 2022; 5:763.
7. Martinez RM, Liang L, Racowsky C, Dioni L, Mansur A, Adir M, Bollati V, Baccarelli AA, Hauser R, Machtinger R. Extracellular microRNAs profile in human follicular fluid and IVF outcomes. *Sci Rep* 2018; 8:17036.
8. Andrade GM, del CM, Meirelles FV, da SJC, Perecin F. Intrafollicular barriers and cellular interactions during ovarian follicle development. *Anim Reprod* 2019; 16:485–496.
9. Raposo G, Stoorvogel W. Extracellular vesicles: exosomes, microvesicles, and friends. *J Cell Biol* 2013; 200:373–383.
10. Göran RK. Extracellular vesicles and energy metabolism. *Clin Chim Acta* 2019; 488:116–121.
11. da Silveira JC, Andrade GM, Del Collado M, Sampaio RV, Sangalli JR, Silva LA, Pinaffi FVL, Jardim IB, Cesar MC, Nogueira MFG, Cesar ASM, Coutinho LL, et al. Supplementation with small-extracellular vesicles from ovarian follicular fluid during in vitro production modulates bovine embryo development. *PLoS One* 2017; 12:e0179451.
12. Hasan MM, Viil J, Lättekivi F, Ord J, Reshi QUA, Jääger K, Velthut-Meikas A, Andronowska A, Jaakma Ü, Salumets A, Fazeli A. Bovine follicular fluid and extracellular vesicles derived from follicular fluid alter the bovine oviductal epithelial cells transcriptome. *Int J Mol Sci* 2020; 21:5365.
13. Santonocito M, Vento M, Guglielmino MR, Battaglia R, Wahlgren J, Ragusa M, Barbagallo D, Borzi P, Rizzari S, Maugeri M, Scollo P, Tatone C, et al. Molecular characterization of exosomes and their microRNA cargo in human follicular fluid: bioinformatic analysis reveals that exosomal microRNAs control pathways involved in follicular maturation. *Fertil Steril* 2014; 102:1751–1761.e1.
14. Hung WT, Hong X, Christenson LK, McGinnis LK. Extracellular vesicles from bovine follicular fluid support cumulus expansion. *Biol Reprod* 2015; 93:117.
15. Gebremedhn S, Gad A, Aglan HS, Laurincik J, Prochazka R, Salilew-Wondim D, Hoelker M, Schellander K, Tesfaye D. Extracellular vesicles shuttle protective messages against heat stress in bovine granulosa cells. *Sci Rep* 2020; 10:15824.
16. Rodrigues TA, Tuna KM, Alli AA, Tribulo P, Hansen PJ, Koh J, Paula-Lopes FF. Follicular fluid exosomes act on the bovine oocyte to improve oocyte competence to support development and survival to heat shock. *Reprod Fertil Dev* 2019; 31:888–897.
17. de Almeida Monteiro Melo Ferraz M, Fujiyama M, Nagashima JB, Noonan MJ, Inoue-Murayama M, Songsasen N. Follicular extracellular vesicles enhance meiotic resumption of domestic cat vitrified oocytes. *Sci Rep* 2020; 10:8619.
18. Morales Dalanezi F, Mogollon Garcia HD, de Andrade FR, Fagali Franchi F, Kubo Fontes P, de Souza Castilho AC, Gouveia Nogueira MF, Dos Santos Schmidt EM, Sartori R, Pinheiro Ferreira JC. Extracellular vesicles of follicular fluid from heat-stressed cows

- modify the gene expression of in vitro-matured oocytes. *Anim Reprod Sci* 2019; 205:94–104.
19. Sutton-McDowall ML, Gilchrist RB, Thompson JG. The pivotal role of glucose metabolism in determining oocyte developmental competence. *Reproduction* 2010; 139:685–695.
 20. Scott R 3rd, Zhang M, Seli E. Metabolism of the oocyte and the preimplantation embryo: implications for assisted reproduction. *Curr Opin Obstet Gynecol* 2018; 30:163–170.
 21. Sanchez-Lazo L, Brisard D, Elis S, Maillard V, Uzbekov R, Labas V, Desmarchais A, Papillier P, Monget P, Uzbekova S. Fatty acid synthesis and oxidation in cumulus cells support oocyte maturation in bovine. *Mol Endocrinol* 2014; 28:1502–1521.
 22. Lundin K, Ahlström A. *Manual of Embryo Culture in Human Assisted Reproduction*, 1st ed. Cambridge, UK: Cambridge University Press; 2021.
 23. Lipinska P, Sell-Kubiak E, Pawlak P, Madeja ZE, Warzych E. Response of bovine cumulus-oocytes complexes to energy pathway inhibition during in vitro maturation. *Genes* 2021; 12:838.
 24. Roy R, Taourit S, Zaragoza P, Eggen A, Rodellar C. Genomic structure and alternative transcript of bovine fatty acid synthase gene (FASN): comparative analysis of the FASN gene between monogastric and ruminant species. *Cytogenet Genome Res* 2005; 111:65–73.
 25. Sastre D, da Costa NN, de Sá AL, Conceição SD, Chiaratti MR, Adona PR, Guemra S, Meirelles FV, Santos Sdo S, Sena L, Ohashi OM, dos Santos EJ, et al. Expression of PLIN2 and PLIN3 during oocyte maturation and early embryo development in cattle. *Theriogenology* 2014; 81:326–331.
 26. Montaigne D, Butruille L, Staels B. PPAR control of metabolism and cardiovascular functions. *Nat Rev Cardiol* 2021; 18:809–823.
 27. Liu S, Lai J, Feng Y, Zhuo Y, Zhang H, Chen Y, Li J, Mei X, Zeng Y, Su J, Deng Y, Jiang F, et al. Acetyl-CoA carboxylase 1 depletion suppresses de novo fatty acid synthesis and mitochondrial β -oxidation in castration-resistant prostate cancer cells. *J Biol Chem* 2023; 299:102720.
 28. Boruszevska D, Sinderewicz E, Kowalczyk-Zieba I, Grycmacher K, Woclawek-Potocka I. The effect of lysophosphatidic acid during in vitro maturation of bovine cumulus-oocyte complexes: cumulus expansion, glucose metabolism and expression of genes involved in the ovulatory cascade, oocyte and blastocyst competence. *Reprod Biol Endocrinol* 2015; 13:44.
 29. Li Y, Li RQ, Ou SB, Zhang NF, Ren L, Wei LN, Zhang QX, Yang DZ. Increased GDF9 and BMP15 mRNA levels in cumulus granulosa cells correlate with oocyte maturation, fertilization, and embryo quality in humans. *Reprod Biol Endocrinol* 2014; 12:81.
 30. Van Deun J, Mestdagh P, Agostinis P, Akay Ö, Anand S, Anckaert J, Martinez ZA, Baetens T, Beghein E, Bertier L, Berx G, Boere J, et al. EV-TRACK: transparent reporting and centralizing knowledge in extracellular vesicle research. *Nat Methods* 2017; 14:228–232.
 31. Azari-Dolatabad N, Raes A, Pavani KC, Asaadi A, Angel-Velez D, Van Damme P, Leroy JLMR, Van Soom A, Pascottini OB. Follicular fluid during individual oocyte maturation enhances cumulus expansion and improves embryo development and quality in a dose-specific manner. *Theriogenology* 202; 166:38–45.
 32. Pavani KC, Meese T, Pascottini OB, Guan X, Lin X, Peelman L, Hamacher J, Van Nieuwerburgh F, Deforce D, Boel A, Heindryckx B, Tilleman K, et al. Hatching is modulated by microRNA-378a-3p derived from extracellular vesicles secreted by blastocysts. *Proc Natl Acad Sci USA* 2022; 119:e2122708119.
 33. Ynsaurrealde-Rivolta AE, Suvá M, Luchetti CG, Bevacqua RJ, Munilla S, Rodriguez-Alvarez L, Velasquez A, Briski O, Lombardo D, Salamone D. DMSO supplementation during in vitro maturation of bovine oocytes improves blastocyst rate and quality. *Theriogenology* 2020; 148:140–148.
 34. Carney RP, Mizenko RR, Bozkurt BT, Lowe N, Henson T, Arizzi A, Wang A, Tan C, George SC. Harnessing extracellular vesicle heterogeneity for diagnostic and therapeutic applications. *Nat Nanotechnol* 2024; 20:14–25.
 35. Parrish JJ, Susko-Parrish JL, Leibfried-Rutledge ML, Critser ES, Eystone WH, First NL. Bovine in vitro fertilization with frozen-thawed semen. *Theriogenology* 1986; 25:591–600.
 36. Warzych E, Pawlak P, Lechniak D, Madeja ZE. WNT signalling supported by MEK/ERK inhibition is essential to maintain pluripotency in bovine preimplantation embryo. *Dev Biol* 2020; 463: 63–76.
 37. de Lima CB, Milazzotto MP, Vireque AA, Joaquim DC, Sobreira TJP, Ferreira CR. Impact of extraction methods and transportation conditions on lipid profiles of bovine oocytes. *Reprod Sci* 2024; 31: 1948–1957.
 38. de Lima CB, Ferreira CR, Milazzotto MP, Sobreira TJP, Vireque AA, Cooks RG. Comprehensive lipid profiling of early stage oocytes and embryos by MRM profiling. *J Mass Spectrom* 2018; 53:1247–1252.
 39. Welsh JA, Goberdhan DCI, O'Driscoll L, Buzas EI, Blenkiron C, Bussolati B, Cai H, Di Vizio D, Driedonks TAP, Erdbrügger U, Falcon-Perez JM, Fu QL, et al. MISEV consortium; Théry C, Witwer KW. Minimal information for studies of extracellular vesicles (MISEV2023): from basic to advanced approaches. *J Extracell Vesicles* 2024; 13:e12404.
 40. Hasan MM, Reshi QUA, Lättetkivi F, Viil J, Godakumara K, Dissanayake K, Andronowska A, Jaakma Ü, Fazeli A. Bovine follicular fluid derived extracellular vesicles modulate the viability, capacitation and acrosome reaction of bull spermatozoa. *Biology (Basel)* 2021; 10:1154.
 41. Neyroud AS, Chiechio RM, Moulin G, Ducarre S, Heichette C, Dupont A, Budzynski M, Even-Hernandez P, Faro MJL, Yefimova M, Marchi V, Ravel C. Diversity of extracellular vesicles in human follicular fluid: morphological analysis and quantification. *Int J Mol Sci* 2022; 23:11676.
 42. Capra E, Kosior MA, Cocchia N, Lazzari B, del Prete C, Longobardi V, Pizzi F, Stella A, Frigerio R, Cretich M, Consiglio AL, Gasparrini B. Variations of follicular fluid extracellular vesicles miRNAs content in relation to development stage and season in buffalo. *Sci Rep* 2022; 12:14886.
 43. Gabryś J, Kij-Mitka B, Sawicki S, Kochan J, Nowak A, Łojko J, Karnas E, Bugno-Poniewierska M. Extracellular vesicles from follicular fluid may improve the nuclear maturation rate of in vitro matured mare oocytes. *Theriogenology* 2022; 188:116–124.
 44. Clarke HJ. Transzonal projections: essential structures mediating intercellular communication in the mammalian ovarian follicle. *Mol Reprod Dev* 2022; 89:509–525.
 45. Pužar Dominkuš P, Stenovec M, Sitar S, Lasič E, Zorec R, Plemenitaš A, Žagar E, Kreft M, Lenassi M. PKH26 labeling of extracellular vesicles: characterization and cellular internalization of contaminating PKH26 nanoparticles. *Biochim Biophys Acta Biomembr* 2018; 1860:1350–1361.
 46. Chiaradia E, Tancini B, Emiliani C, Delo F, Pellegrino RM, Tognoloni A, Urbanelli L, Buratta S. Extracellular vesicles under oxidative stress conditions: biological properties and physiological roles. *Cells* 202; 10:1763.
 47. Eldh M, Ekström K, Valadi H, Sjöstrand M, Olsson B, Jernäs M, Lötval J. Exosomes communicate protective messages during oxidative stress; possible role of exosomal shuttle RNA. *PLoS One* 2010; 5:e15353.
 48. Aardema H, van Tol HTA, Vos PLAM. An overview on how cumulus cells interact with the oocyte in a condition with elevated NEFA levels in dairy cows. *Anim Reprod Sci* 2019; 207:131–137.
 49. Gabryś J, Gurgul A, Szmatoła T, Kij-Mitka B, Andronowska A, Karnas E, Kucharski M, Wojciechowska-Puchalka J, Kochan J, Bugno-Poniewierska M. Follicular fluid-derived extracellular vesicles influence on in vitro maturation of equine oocyte: impact on cumulus cell viability, expansion and transcriptome. *Int J Mol Sci* 2024; 25:3262.
 50. Lopez-Casillas F, Bai DH, Luo X, Kong IS, Hermodson MA, Kim KH. Structure of the coding sequence and primary amino acid sequence of acetyl-coenzyme a carboxylase. *Proc Natl Acad Sci* 1988; 85:5784–5788.

51. Benedetti C, Pavani KC, Gansemans Y, Azari-Dolatabad N, Pascottini OB, Peelman L, Six R, Fan Y, Guan X, Deserranno K, Fernández-Montoro A, Hamacher J, *et al.* From follicle to blastocyst: microRNA-34c from follicular fluid-derived extracellular vesicles modulates blastocyst quality. *J Anim Sci Biotechnol* 2024; **15**:104.
52. Pawlak P, Lipinska P, Sell-Kubiak E, Kajdasz A, Derebecka N, Warzych E. Energy metabolism disorders during in vitro maturation of bovine cumulus-oocyte complexes interfere with blastocyst quality and metabolism. *Dev Biol* 2024; **509**: 51–58.
53. Slotte JP. Biological functions of sphingomyelins. *Prog Lipid Res* 2013; **52**:424–437.
54. Wang T, Fu X, Chen Q, Patra JK, Wang D, Wang Z, Gai Z. Arachidonic acid metabolism and kidney inflammation. *Int J Mol Sci* 2019; **20**:3683.
55. Morita SY, Ikeda Y. Regulation of membrane phospholipid biosynthesis in mammalian cells. *Biochem Pharmacol* 2022; **206**: 115296.
56. Nihad M, Sen U, Chaudhury D, Das UN, Shenoy PS, Bose B. Arachidonic acid modulates the cellular energetics of human pluripotent stem cells and protects the embryoid bodies from embryotoxicity effects in vitro. *Reprod Toxicol* 2023; **120**:108438.
57. Wang X, Yang C, Huang C, Wang W. Dysfunction of the carnitine cycle in tumor progression. *Heliyon* 2024; **10**:e35961.
58. van der Veen JN, Kennelly JP, Wan S, Vance JE, Vance DE, Jacobs RL. The critical role of phosphatidylcholine and phosphatidylethanolamine metabolism in health and disease. *Biochim Biophys Acta Biomembr* 2017; **1859**:1558–1572.
59. Calzada E, Onguka O, Claypool SM. Phosphatidylethanolamine metabolism in health and disease. *Int Rev Cell Mol Biol* 2016; **321**:29–88.

Supplementary file 1. The sequences of primers, length, and efficiency of products obtained from mRNA gene expression experiment. The genes listed below were analyzed in oocytes and cumulus cells. F – forward primer sequence, R – reverse primer sequence.

Gene	Sequences of Primers (F, R)	Length (bp)	Efficiency
<i>FASN</i>	F – CTGCCGAAGACAGGGATTG R – CTGGTATACCTTCCCGCTCG	108	1.822
<i>PPARA</i>	F – AGTGCCTTTCAGTTGGGATGTC R – CGCGGTTTCGGAATCTTCTA	125	2.179
<i>ACACA</i>	F – GGGAACCGTGAAGGCCTA R – TGGACCAAGCTGCGGAT	159	2.052
<i>PLIN2</i>	F – GAGTGGAAGAGAAGCATCGG R – GTGACTCAATGTGCTCAGCA	67	1.91
<i>GDF9</i>	F – AGCGCCCTCACTGCTTCTATAT R – TTCCTTTTAGGGTGGAGGGAA	80	2.079
<i>Glut1</i>	F – ATCCTCATTGCCGTGGTGCT R – ACGATGCCAGAGCCGATGGT	133	1.964
<i>GAPDH</i>	F – ACCCTCAAGATTGTCAGCAA R – GCGTGGACAGTGGTCATAAG	113	2.035

<i>YWHAZ</i>	F – TGA ACTCCCCTGAGAAAGCCT	149	2.079
	R – ATCCGATGTCCACAATGTCAAG		

Supplementary File 2

Column1	Column2
Lipid species	Fold Change
CAR(22:0)	1.5815
PE(38:6)	1.5765
PC(34:2)	0.65036
PC(O-35:2)	0.65036
PC(P-35:1)	0.65036
TG(52:0)	0.62366
TG(53:7)	0.62366
TG(55:11)	0.6218
(9Z)-3-hydroxyoctadecenoylcarnitine	0.61664
TG(55:8)	0.61264
CAR(18:1)	0.55492
CAR(18:4)	0.52432
12-Hydroxy-12-octadecanoylcarnitine	0.44878
3-hydroxyoctadecanoylcarnitine	0.44878
O-(13-carboxytridecanoyl)carnitine	0.42861
CAR(20:0)	0.40841
O-(11-carboxyundecanoyl)carnitine	0.37613
CAR(17:0)	0.36545
3-hydroxyarachidonoylcarnitine	0.35104
CAR(16:0)	0.34281
CAR(22:4)	0.31879
O-(17-carboxyheptadecanoyl)carnitine	0.31263
2-Hydroxymyristoylcarnitine	0.3089
3-hydroxytetradecanoylcarnitine	0.3089

Supplementary File 3

Column1	Column2
Lipid species	Fold Change
SM(d16:1/18:0)	2.4516
CAR(16:0)	1.9904
PC(36:1)	1.9844
PC(O-37:1)	1.9844
PC(O-38:8)	1.9844
PC(P-37:0)	1.9844
PS(O-41:0)	1.978
PC(34:1)	1.934
PC(O-35:1)	1.934
PC(P-35:0)	1.934
PS(O-18:0)	1.8914
PS(P-36:0)	1.8697
TG(52:1)	1.8686
PG(P-35:1)	1.7975
O-(13-carboxytridecanoyl)carnitine	1.7927
PE(33:2)	1.7905
PE(O-34:2)	1.7905
PE(P-34:1)	1.7905
PS(O-16:0)	1.7678
PE(36:1)	1.7496
PE(O-37:1)	1.7496
PE(O-38:8)	1.7496
PE(P-37:0)	1.7496
PE(35:5)	1.7416
PE(O-36:5)	1.7416
PE(P-36:4)	1.7416
CE(18:1)	1.7317
PC(34:3)	1.7316
PC(P-35:2)	1.7316
CAR(20:0)	1.6908
PS(P-33:1)	1.6435
PI(39:4)	1.6295
PI(O-40:4)	1.6295
PI(P-40:3)	1.6295
PC(30:0)	1.6221
PC(O-31:0)	1.6221
TG(48:1)	1.6202
TG(49:8)	1.6202
PS(O-38:0)	1.6147
PE(38:2)	1.6091
PE(O-40:9)	1.6091
PE(P-39:1)	1.6091
PS(P-31:1)	1.5968
PC(35:1)	1.5923
PC(36:8)	1.5923
PC(O-36:1)	1.5923

PC(P-36:0)	1.5923
TG(51:9)	1.5918
TG(53:10)	1.5883
PC(36:2)	1.5814
PC(O-37:2)	1.5814
PC(O-38:9)	1.5814
PC(P-37:1)	1.5814
PS(P-29:0)	1.5783
TG(48:2)	1.5661
CAR(8:0)	1.5532
PE(38:5)	1.5339
3-hydroxytetradecanoylcarnitine	1.5332
2-Hydroxymyristoylcarnitine	1.5332
PG(O-35:2)	1.5328
(9Z.12Z.15Z)-3-hydroxyoctadecatrienoylcarnitine	1.5246
TG(54:1)	1.5172
PE(33:1)	1.5121
SM(d18:1/24:1(15Z))	1.5105
CE(22:5)	1.5092

Załącznik 2

Imię i nazwisko współautora pracy: **Ewelina Warzych-Plejer**

Afiliacja: **Katedra Genetyki i Podstaw Hodowli Zwierząt, Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu**

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy: **Paulina Lipinska, Katrien Smits, Ann Van Soom, Krishna Chaitanya Pavani, Ewelina Warzych, 2025, „Follicular fluid extracellular vesicles support energy metabolism of bovine oocytes, improving blastocyst development and quality” Biol Reprod, doi: 10.1093/biolre/ioaf096**, mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na: * stworzeniu koncepcji i przygotowaniu projektu badań, pozyskaniu części funduszy, nadzorze nad częścią doświadczalną, wykonaniu fluorescencyjnego barwienia pęcherzyków zewnątrzkomórkowych, pomocy w interpretacji wyników, wiodącym współautorstwie w opracowaniu manuskryptu.

Data9.05.2025.....

Podpis

Ewelina Warzych-Plejer

- * wpisać właściwe: autorstwo koncepcji, przygotowanie projektu badań, opracowanie krytycznego przeglądu literatury, opracowanie założeń i metod, przeprowadzenie badań, w tym zbieranie danych, analiza wyników, interpretacja wyników i sformułowanie wniosków, obliczenia statystyczne, opracowanie grafik, opracowanie manuskryptu, inne (należy wskazać)

Attachment 2

First name and surname of the co-author of the work: **Katrien Smits**

Affiliation: **Department of Internal Medicine, Reproduction and Population Medicine, Ghent University, Merelbeke, Belgium**

Declaration on co-authorship

I hereby declare that in the work: **Paulina Lipinska, Katrien Smits, Ann Van Soom, Krishna Chaitanya Pavani, Ewelina Warzych, 2025, Follicular fluid extracellular vesicles support energy metabolism of bovine oocytes, improving blastocyst development and quality, Biology of Reproduction, DOI 10.1093/biolre/ioaf096**, my individual contribution to its preparation consisted in* preparation of the manuscript.

Date 08/05/2025



signature

* enter as appropriate: authorship of the concept, preparation of a research project, elaboration of a critical literature review, elaboration of assumptions and methods, execution of research, including collection of data, analysis of results, interpretation of results and formulation of conclusions, statistical calculations, preparation of figures, preparation of the manuscript, others (indicate as appropriate)

Attachment 2

First name and surname of the co-author of the work: **Ann Van Soom**

Affiliation: **Department of Internal Medicine, Reproduction and Population Medicine, Ghent University, Merelbeke, Belgium**

Declaration on co-authorship

I hereby declare that in the work: **Paulina Lipinska, Katrien Smits, Ann Van Soom, Krishna Chaitanya Pavani, Ewelina Warzych, 2025, Follicular fluid extracellular vesicles support energy metabolism of bovine oocytes, improving blastocyst development and quality, Biology of Reproduction, DOI 10.1093/biolre/ioaf096**, my individual contribution to its preparation consisted in* preparation of the manuscript.

Date8 may 2025.....
.....

... 

signature

* enter as appropriate: authorship of the concept, preparation of a research project, elaboration of a critical literature review, elaboration of assumptions and methods, execution of research, including collection of data, analysis of results, interpretation of results and formulation of conclusions, statistical calculations, preparation of figures, preparation of the manuscript, others (indicate as appropriate)

Attachment 2

First name and surname of the co-author of the work: **Krishna Chaitanya Pavani**

Affiliation: **1) Department of Internal Medicine, Reproduction and Population Medicine, Ghent University, Merelbeke, Belgium; 2) Department for Reproductive Medicine, Ghent University Hospital, Cornell Heymanslaan 10, 9000 Gent, Belgium**

Declaration on co-authorship

I hereby declare that in the work: **Paulina Lipinska, Katrien Smits, Ann Van Soom, Krishna Chaitanya Pavani, Ewelina Warzych, 2025, Follicular fluid extracellular vesicles support energy metabolism of bovine oocytes, improving blastocyst development and quality, Biology of Reproduction, DOI 10.1093/biolre/ioaf096**, my individual contribution to its preparation consisted in* partial execution of research (FF-EVs isolation and evaluation) and preparation of the manuscript.

Date 08/05/2025

P. Krishna Chaitanya
signature

* enter as appropriate: authorship of the concept, preparation of a research project, elaboration of a critical literature review, elaboration of assumptions and methods, execution of research, including collection of data, analysis of results, interpretation of results and formulation of conclusions, statistical calculations, preparation of figures, preparation of the manuscript, others (indicate as appropriate)



OPEN ACCESS

EDITED BY

Jennifer R. Wood,
University of Nebraska System,
United States

REVIEWED BY

Alan D. Ealy,
Virginia Tech, United States
Megan Lim,
University of Adelaide, Australia

*CORRESPONDENCE

Ewelina Warzych,
✉ ewelina.warzych@up.poznan.pl

RECEIVED 16 March 2023

ACCEPTED 26 April 2023

PUBLISHED 12 May 2023

CITATION

Lipinska P, Pawlak P and Warzych E
(2023), Species and embryo genome
origin affect lipid droplets in
preimplantation embryos.
Front. Cell Dev. Biol. 11:1187832.
doi: 10.3389/fcell.2023.1187832

COPYRIGHT

© 2023 Lipinska, Pawlak and Warzych.
This is an open-access article distributed
under the terms of the [Creative
Commons Attribution License \(CC BY\)](#).
The use, distribution or reproduction in
other forums is permitted, provided the
original author(s) and the copyright
owner(s) are credited and that the original
publication in this journal is cited, in
accordance with accepted academic
practice. No use, distribution or
reproduction is permitted which does not
comply with these terms.

Species and embryo genome origin affect lipid droplets in preimplantation embryos

Paulina Lipinska, Piotr Pawlak and Ewelina Warzych*

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

Mammalian embryo development is affected by multiple metabolism processes, among which energy metabolism seems to be crucial. Therefore the ability and the scale of lipids storage in different preimplantation stages might affect embryos quality. The aim of the present studies was to show a complex characterization of lipid droplets (LD) during subsequent embryo developmental stages. It was performed on two species (bovine and porcine) as well as on embryos with different embryo origin [after *in vitro* fertilization (IVF) and after parthenogenetic activation (PA)]. Embryos after IVF/PA were collected at precise time points of development at the following stages: zygote, 2-cell, 4-cell, 8/16-cell, morula, early blastocyst, expanded blastocyst. LD were stained with BODIPY 493/503 dye, embryos were visualized under a confocal microscope and images were analyzed with the ImageJ Fiji software. The following parameters were analyzed: lipid content, LD number, LD size and LD area within the total embryo. The most important results show that lipid parameters in the IVF vs. PA bovine embryos differ at the most crucial moments of embryonic development (zygote, 8–16-cell, blastocyst), indicating possible dysregulations of lipid metabolism in PA embryos. When bovine vs. porcine species are compared, we observe higher lipid content around EGA stage and lower lipid content at the blastocyst stage for bovine embryos, which indicates different demand for energy depending on the species. We conclude that lipid droplets parameters significantly differ among developmental stages and between species but also can be affected by the genome origin.

KEYWORDS

embryo, lipid droplet (LD), lipid metabolism, porcine, bovine, parthenotes

1 Introduction

Mammalian preimplantation embryo development is a complex, well-organized process involving many changes both on a molecular and cellular level. The crucial processes determining embryo quality are, e.g., proper fertilization, the timing of the first cleavage, genome activation and epigenetic reprogramming involving methylation/demethylation and histone modifications (Deutsch et al., 2014; Sudano et al., 2016). Embryo quality may be effectively evaluated in many aspects related to metabolic pathways, including energy metabolism.

The main energy sources for embryos are carbohydrates and lipids (Bradley et al., 2016). Embryos at the early stages of development utilize mainly pyruvate and lactate, while from the morula stage, the glucose requirement increases (Leese, 2012). The energy metabolism within the first cleavages of bovine embryos, up to the embryonic genome activation (EGA) at the 8/16-cell stage, is relatively slow and depends on maternal mRNA, proteins and

metabolites collected in the cytoplasm during oocyte growth and maturation (de Lima et al., 2018). Shortly before and following the EGA, there is a noticeable increase in energy demand due to further cell proliferation and differentiation, formation of blastocoel and hatching (Milazzotto et al., 2020; Milazzotto et al., 2022). Energy demand within the blastocysts varies between inner cell mass (ICM) and trophoblast (TE), since in mice glucose metabolism inhibition negatively affects TE development while ICM remains unchanged (Chi et al., 2020). Embryos can also use amino acids metabolic pathways for energy production, yet studies show that when the amino acid metabolism increases—the bovine embryo quality decreases (Leese, 2012).

An important element of the energy metabolism of oocytes and embryos is the uptake and storage of lipids. Embryos lipidome is sensitive to external factors, e.g., *in vivo* versus *in vitro* system of embryos culture, where higher lipid accumulation is observed in the *in vitro*-produced embryos or in response to stress (Sudano et al., 2011; Janati Idrissi et al., 2021; Melo-Sterza and Poehland, 2021). Moreover, lipid metabolic pathways show distinct activities when subsequent stages of embryo development are compared depending on the species (cattle vs. mouse) or origin (*in vivo* vs. *in vitro*) (Milazzotto et al., 2022). Therefore, lipid metabolism characteristics might be related to embryo quality and considered an important embryo viability marker/parameter (Ghanem et al., 2014; Milazzotto et al., 2016).

Lipids are stored in the cells as triacylglycerols (TAGs) and sterol esters in organelles called lipid droplets (LD). Fatty acids, which are the products of TAGs hydrolysis, might be transferred from LD into mitochondria and metabolized via β -oxidation. Lipid droplets are highly dynamic organelles, able to change their size, number, and location within the cytoplasm. The morphology of lipid droplets may change during embryo development in order to store more lipids and/or to enlarge the contact area with other organelles (Ibayashi et al., 2021). Moreover, substantial metabolic switches after EGA also affect the lipid profile, lipids utilization and metabolic pathways. The TAG and cholesterol esters are the most dynamic (with the largest quantitative changes) lipid subclasses comparing the early development stages (2-cell and 8-cell embryos) to the blastocyst stage of bovine embryos (de Lima et al., 2018; Milazzotto et al., 2022). Furthermore, LD number changes during the sequential stages of embryogenesis in cattle, however, not all stages have been described (Sudano et al., 2016). It has been also suggested that lipid droplets distribution may reflect the metabolic state of an oocyte or embryo since LD dispersion is linked with a more efficient β -oxidation process while LD fusion with increased glycolysis (Bradley and Swann, 2019).

Lipid metabolism of oocytes and embryos is affected by many factors, e.g., lipid content noticeably varies among species. The contradictory lipid content values are observed in porcine oocytes (156 ng of total free fatty acids content) and murine (4 ng), while bovine takes intermediate values—58 ng (Bradley and Swann, 2019). That disproportion is also observed in the embryos. Porcine embryos, highly rich in lipids, can develop relying on lipids as the only energy source while mouse embryos lipid metabolism and lipid content tend to be low since they utilize pyruvate as the main source of energy (Bradley and Swann, 2019). For bovine embryos, the high intracellular lipid level can lead to metabolic defects and directly to compromised development (Ferguson and Leese, 1999;

Shi and Sirard, 2022). It is suggested that bovine and porcine embryos may require different culture conditions to support their energy demands in the *in vitro* system. Therefore expanding knowledge about lipid metabolism in subsequent steps of preimplantation development of both species is expected.

Another factor, that may affect lipid metabolism, is embryo genome origin. Mammalian oocytes can be parthenogenetically activated *in vitro*, without the involvement of a male gamete. There are several mechanisms of parthenogenetic activation (PA) known in nature and applied to laboratory experiments, however, the one that allows analyzing the impact of paternal genome deficiency on embryo development considers the resumption of meiosis by chemical activation without second polar body extrusion. It results in the formation of a diploid zygote composed solely of maternal DNA. The mammalian PA embryos can develop to various stages of development depending on the species but never to term. Porcine parthenogenetic embryos may develop up to day 29 (Kure-Bayashi et al., 2000). A significant impact of paternal genome contribution in embryo development has been documented by 25 differentially expressed imprinted genes involved in, e.g., cell proliferation, growth and differentiation, RNA processing and apoptosis between IVF and PA porcine embryos (collected at day 28 or 30) (Bischoff et al., 2009). This is due to the fact that selected genes are subjected to parental imprinting. As a result, the paternal or maternal origin of an allele affects its transcriptional activity. Additionally, there is a difference in the most active stage of transcription—morula stage for PA and blastocyst stage for IVF porcine embryos revealed by the largest number of differentially expressed genes during these stages. The PA embryos also showed enrichment in apoptosis processes (Li et al., 2021). No data on the lipid metabolism in PA vs. IVF embryos have been previously reported, which seems like a very interesting issue. It would indicate whether genome imprinting disruptions affect, e.g., lipid storage or catabolism, which might be negative for embryo development.

The objective of the present work was to perform complex characterization of lipid droplets during subsequent developmental stages of porcine and bovine embryos. Moreover, two main factors with potential effects on LD have been studied: species-specificity (bovine vs. porcine) and embryo genome origin (IVF vs. PA).

2 Materials and methods

Unless otherwise stated, all reagents were supplied by Merck Group.

2.1 Collection of cumulus-oocyte complexes

The oocyte-cumulus complexes (COCs) were obtained from bovine and porcine ovarian follicles (3–5 mm diameter). Immature COCs were collected by aspiration with a needle and syringe and analyzed morphologically in HEPES medium. COCs with at least 3–4 layers of cumulus cells and without signs of degradation cytoplasm were selected for the experiment.

TABLE 1 Porcine and bovine embryos in subsequent development stages with exact collection times.

Embryonic stage	Time after gamete coincubation (<i>in vitro</i> fertilization) or after parthenogenetic activation [h]	
	Pig (h)	Cattle (h)
Zygote	4	20
2-cell embryo	24	30
4-cell embryo	54	48
8–16-cell embryo	92	80
Morula	104	120
Early blastocyst	140	168
Blastocyst	150	192

2.2 *In vitro* maturation

In vitro maturation (IVM) was performed in four-well (Nunc) plates in 500 μ L of maturation medium under conditions: 5% CO₂ in the atmosphere, 38.5°C and maximum humidity (for porcine) and at 39°C (for bovine), 5% CO₂ at maximum humidity.

Bovine COCs were matured in the following medium: TCM199+Glutamax (Gibco, Thermo Fisher Scientific, MA, United States) supplemented with 6 mg/mL fafBSA (fatty acid free bovine serum albumin), 0.25 mM Na pyruvate, 1x concentrated penicillin-streptomycin solution, 2 μ g/mL FSH and 1 μ g/mL β -estradiol for 24 h.

For porcine IVM, the first 24 h included NCSU-23 medium (North Carolina State University Medium-23) supplemented with hormones: 10 U PMSG (pregnant mare serum gonadotropin, Chorulon, MSD Animal Health, NL, United States), 10 U hCG (Folligon, MSD Animal Health, NL, United States) and 10% of follicular fluid. Next COCs were transferred to a fresh medium without hormones for 20 h (Pawlak et al., 2018). After maturation, COCs were either denuded and parthenogenetically activated (bovine and porcine) or COCs with cumulus cells included were *in vitro* fertilized (bovine).

2.3 *In vitro* fertilization/parthenogenetic activation, embryo culture

For bovine *in vitro* fertilization (IVF), good quality semen from two bulls was purchased from the commercial artificial insemination station. The motile fraction of the sperm was selected with BoviPure™ System according to the producer protocol (Nidacon, Mölndal, Sweden). Shortly, semen was thawed and centrifuged in two layers of 80% and 40% BoviPure™ solution at 300 g $\times$ 15 min, then the precipitate was washed in BoviWash™ solution. Final semen concentration was counted under the microscope (Nikon YS2-T) in Burker Chamber (BRANDT) and gamete coincubation was carried out with a semen concentration of 1×10^6 /ml for 20 h. IVF medium was supplemented with PHE (penicillin, hypotaurine, epinephrine).

Parthenogenetic activation of denuded bovine and porcine oocytes was carried by incubation in 5 μ M Ionomycin in

TALP-medium for 5 min followed by 4 h incubation in 2 mM 6-DMAP (6-(Dimethylamino)purine) in final embryo culture medium supplemented with BSA.

SOF+fafBSA (for bovine; Warzych et al., 2020) and NCSU23/NCSU23+FBS (for porcine; Pawlak et al., 2020); media were used as embryo culture media up to the expanded blastocyst stage. On day 5 post-insemination/post-activation, half of the drop volume was replaced with fresh medium.

Embryos in subsequent stages of preimplantation development were collected at specific time points listed in Table 1. Three experimental groups were designed: b.IVF (bovine embryos after *in vitro* fertilization), b.PA (bovine embryos after parthenogenetic activation) and p.PA (porcine embryos after parthenogenetic activation).

2.4 Lipid droplet staining, microscope analysis and image analysis

Embryos were fixed in 4% PFA (paraformaldehyde) for 30 min in a four-well (Nunc) plate. PFA was removed by 3x washing in PBS+0.2% PVP (5 min) and stored at 4°C. Fixed embryos were permeabilized with 0.2% Triton X-100 solution for 20 min at room temperature and washed 3x in PBS+0.2% PVP (5 min). For lipid droplets staining, 20 μ g/mL BODIPY 493/503 dye (Thermo Fisher Scientific, MA, United States) was used at room temperature for 1 h. Additionally, chromatin was visualized by staining with 0.5 μ g/mL Vectashield DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI; Vector Laboratories, Burlingame, CA, United States) and cytoskeleton by 1x Phalloidine for more accurate cell contours visualization (iFluor 555 Reagent, Abcam, Cambridge, United Kingdom). Embryos (from zygotes to early blastocysts) were mounted on glass slides with single concave (Comex, PL). For expanded blastocyst, μ -Slide, 18 Well-Flat ibiTreat plates (ibidi, GmbH, Germany) with polylysine instead of glass slides were used. Embryos were analyzed using a confocal microscope Zeiss LSM 880 using 488 nm filter with bandpass 500–550 nm for BODIPY 493/503 (laser Argon2) and 420–480 nm for DAPI (laser Diode 405) and 567–650 nm for Phalloidine with LD LCI Plan Apochromat 40x/1.2 Imm Korr DIC 27 objective (Zeiss, Germany). Each embryo was photographed in 5 μ m intervals, from the top slice (with the first

capture of LD) to the equatorial section. Extended blastocysts were situated on the slide in a certain way to allow confocal visualization of both inner cell mass and trophectoderm. ICM and TE cells were distinguished based on cell shape. For the entire experiment, the settings for bovine (IVF and PA) and porcine embryos remained unchanged. Obtained images were analyzed in terms of lipid parameters [lipid content, lipid droplets number, lipids droplets size and area occupied by lipid droplets (%)] with the ImageJ Fiji software version v1.53c (NIH, Bethesda, MD, United States). Lipid content was assessed with the following formula: integrated density value—(total embryo area value $\times$ background fluorescence value). The remaining parameters (LD number, size and area) were measured using the “analyze particle” command, which recognized and read the fluorescence signals that stood out above the photo background. The area occupied by lipid droplets (%) was automatically calculated on the basis of fluorescence to non-fluorescence signal ratio. The additional use of the “watershed” command enabled to eliminate possible LD clusters generated by the Fiji software. For all analyzed parameters, the value of each slice was calculated separately and the mean value per slice was the final result of the calculation. It avoided high variability due to the size variation among embryo stages. In order to analyze the lipid content within the inner cell mass in relation to the entire expanding blastocyst, additional measurements (according to the protocol) were made for the area occupied by the ICM.

2.5 Statistical analysis

The analysis of the distribution of the collected embryos was carried out by the Shapiro-Wilk test and statistical significance comparison by Wilcoxon test and the Kruskal-Wallis test in statistical package R (<https://cran.r-project.org/>). The comparison between ICM of expanded blastocysts was performed with a chi-square test.

3 Results

Embryos of both species and originating from either IVF or PA systems at each stage of development were collected from 3 to 5 *in vitro* production replicates. More than one developmental stage have been collected from a single experimental replicate. The cleavage and blastocysts rates were as follows: b.IVF—80% and 20%, b.PA—79% and 17%, p.PA—70% and 26%.

3.1 Bovine IVF embryos lipid characterization

Lipid parameters (lipid content, lipid droplets number, lipid droplets size and percentage area occupied by lipid droplets within the embryo) were analyzed in 131 individual bovine IVF embryos (b.IVF) from 7 developmental stages (zygote, $n = 19$; 2-cell, $n = 18$; 4-cell, $n = 20$; 8–16-cell, $n = 18$; morula, $n = 22$; early blastocyst = 20; expanded blastocyst, $n = 15$). Confocal visualization and computer analysis revealed numerous significant alterations between subsequent development stages. A comparison between each stage of embryo development vs. the previous stage is presented

in [Figure 1](#) (2-cell vs. zygote, 4-cell vs. 2-cell, 8–16-cell vs. 4-cell, morula vs. 8–16-cell, early blastocyst vs. morula, expanded blastocyst vs. early blastocyst). The summarized total statistical results are shown in the supplementary data ([Supplementary Table S1](#)).

There is a decrease in lipid content and the area occupied by lipid droplets parameters between early developmental stages, reaching the lowest point at 8–16-cell stage. The highest value of lipid content is observed at the 4-cell stage. A gradual decrease is observed in lipid droplets number from zygote up to 8–16-cell stage, moreover, a significant increase of this parameter is observed at the expanded blastocyst stage. Lipid droplets size scores the highest value in zygotes, while after a significant decrease at the 4-cell stage, it remains constant in subsequent stages.

3.2 Bovine PA embryos lipid characterization

Lipid parameters (lipid content, lipid droplets number, lipid droplets size and percentage area occupied by lipid droplets) were analyzed in 123 individual bovine parthenogenetic embryos (b.PA) from 7 development stages (zygote, $n = 19$; 2-cell, $n = 20$; 4-cell, $n = 14$; 8–16-cell, $n = 18$; morula, $n = 22$; early blastocyst = 15; expanded blastocyst, $n = 15$). Confocal visualization and computer analysis revealed numerous significant alterations between subsequent development stages. A comparison between each stage of embryo development vs. the previous stage is presented in [Figure 2](#) (2-cell vs. zygote, 4-cell vs. 2-cell, 8–16-cell vs. 4-cell, morula vs. 8–16-cell, early blastocyst vs. morula, expanded blastocyst vs. early blastocyst). The summarized total statistical results are shown in the supplementary data ([Supplementary Table S2](#)).

We found a significant drop in values for lipid content and LD number parameters at the early blastocyst stage followed by a sudden increase in the expanded blastocyst stage. The analysis also shows that the lipid droplets size parameter was the lowest in the zygote stage, then it increased significantly in the 2-cell stage, staying stable during further stages of development.

3.3 Porcine PA embryos lipid characterization

Lipid parameters (lipid content, lipid droplets number, lipid droplets size and percentage area occupied by lipid droplets) were analyzed in 130 individual porcine parthenogenetic embryos (p.PA) from 7 development stages (zygote, $n = 21$; 2-cell, $n = 21$; 4-cell, $n = 19$; 8–16-cell, $n = 21$; morula, $n = 17$; early blastocyst = 20; expanded blastocyst, $n = 11$). Confocal visualization and computer analysis revealed numerous significant alterations between subsequent development stages. A comparison between each stage of embryo development vs. the previous stage is presented in [Figure 3](#) (2-cell vs. zygote, 4-cell vs. 2-cell, 8–16-cell vs. 4-cell, morula vs. 8–16-cell, early blastocyst vs. morula, expanded blastocyst vs. early blastocyst). The summarized total statistical results are shown in the supplementary data ([Supplementary Table S3](#)).

The expanded blastocyst stage was characterized by the highest values in all analyzed parameters. The lipid content was decreasing at 8–16 and morula stage and peak at the highest values in the

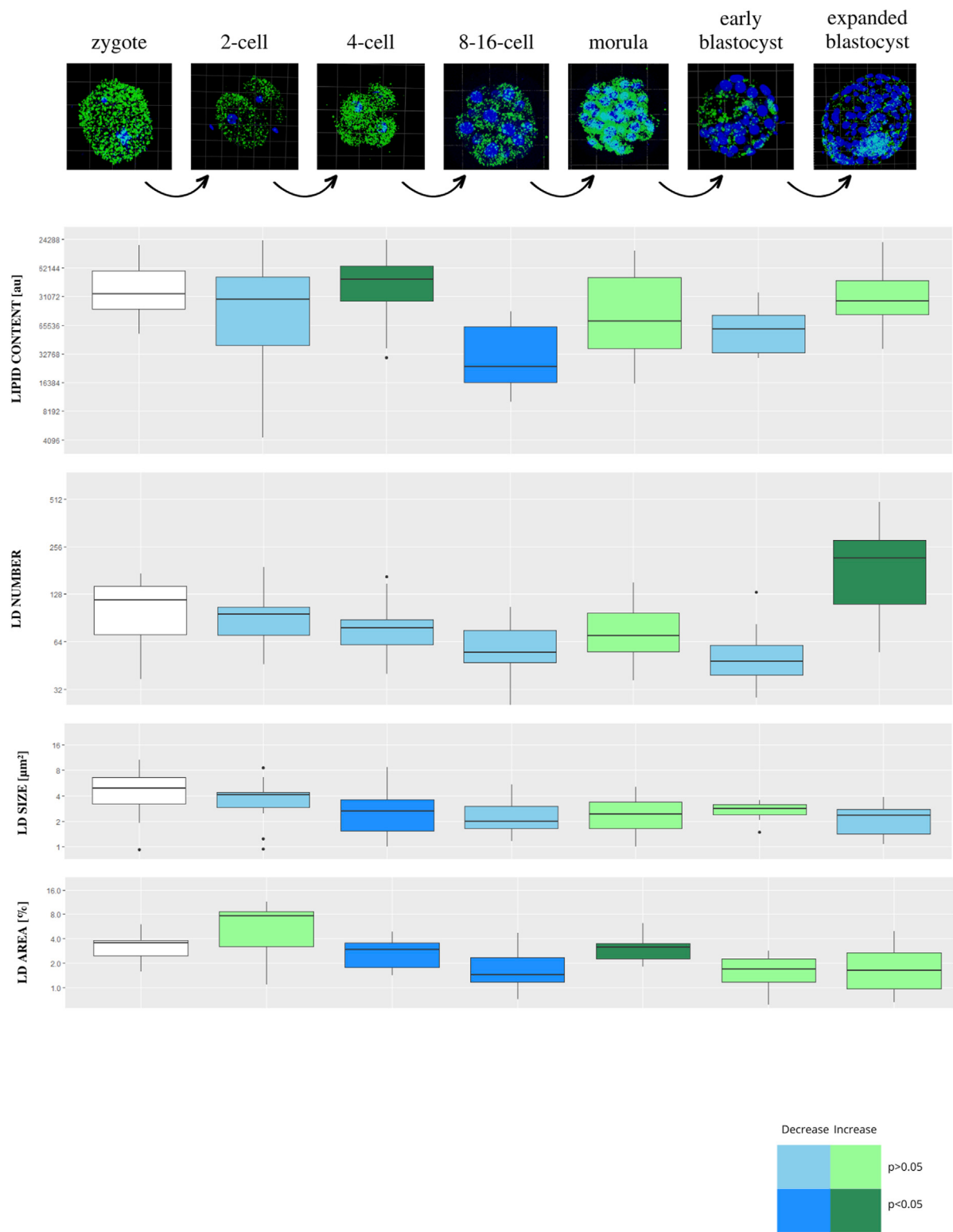
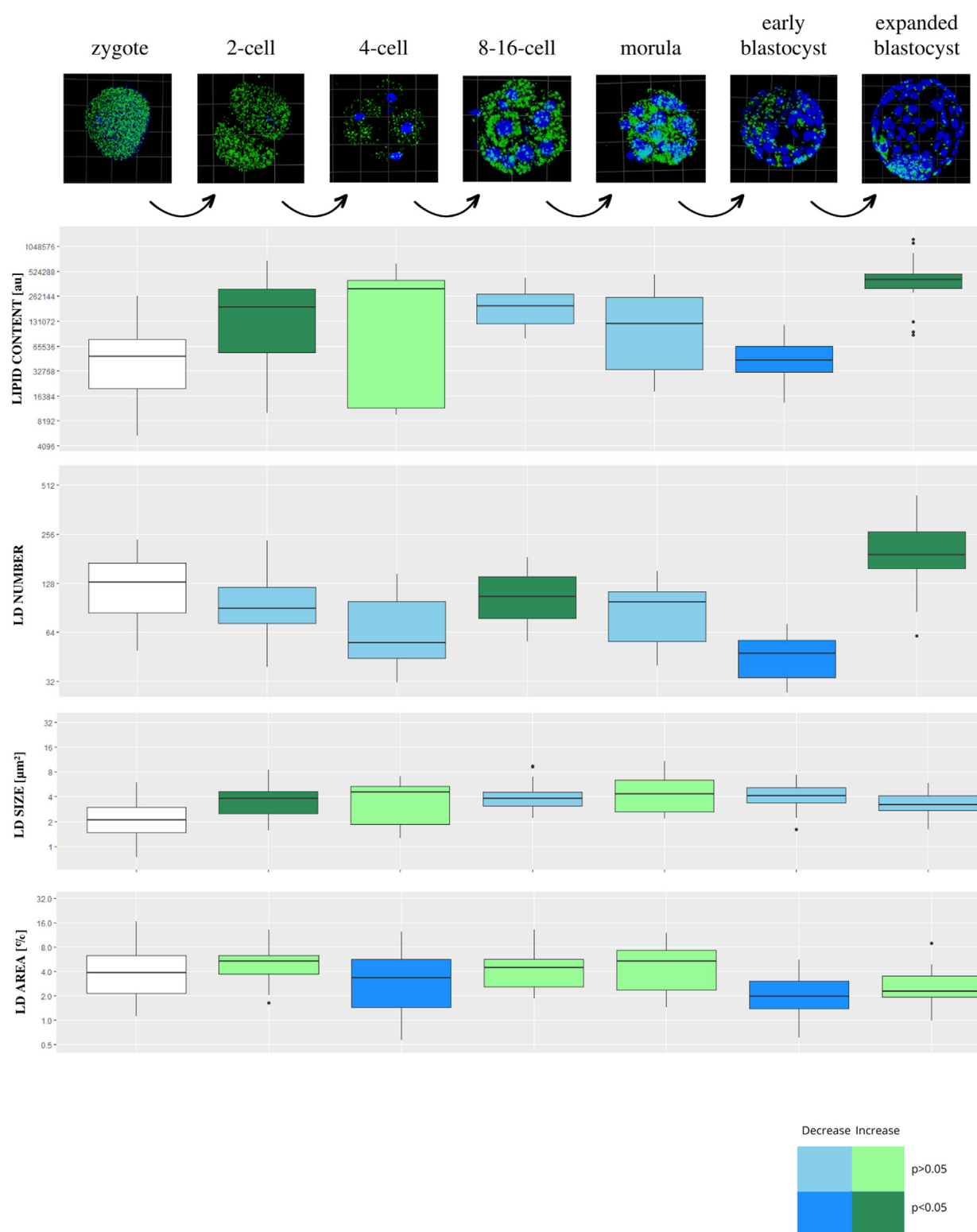
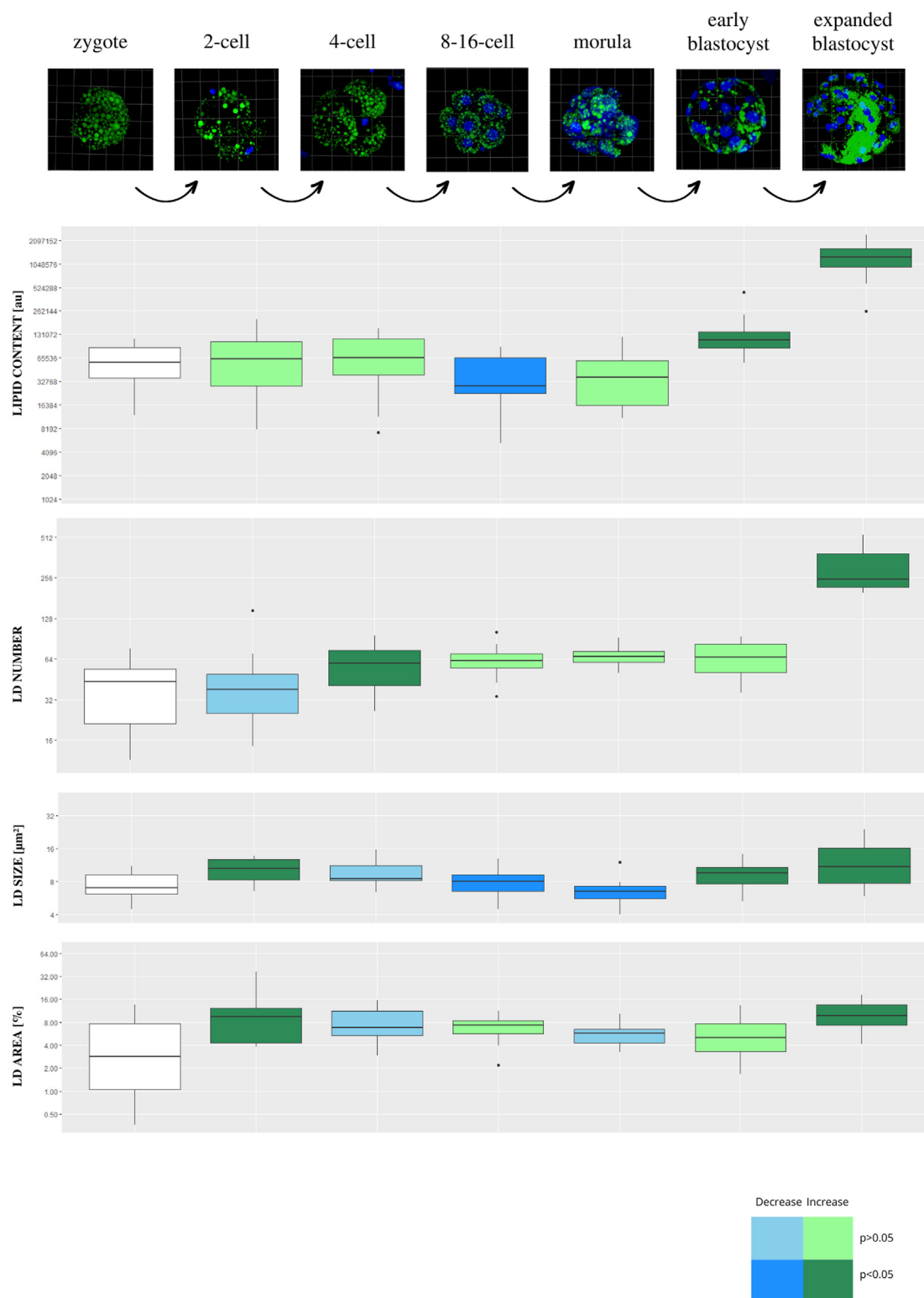


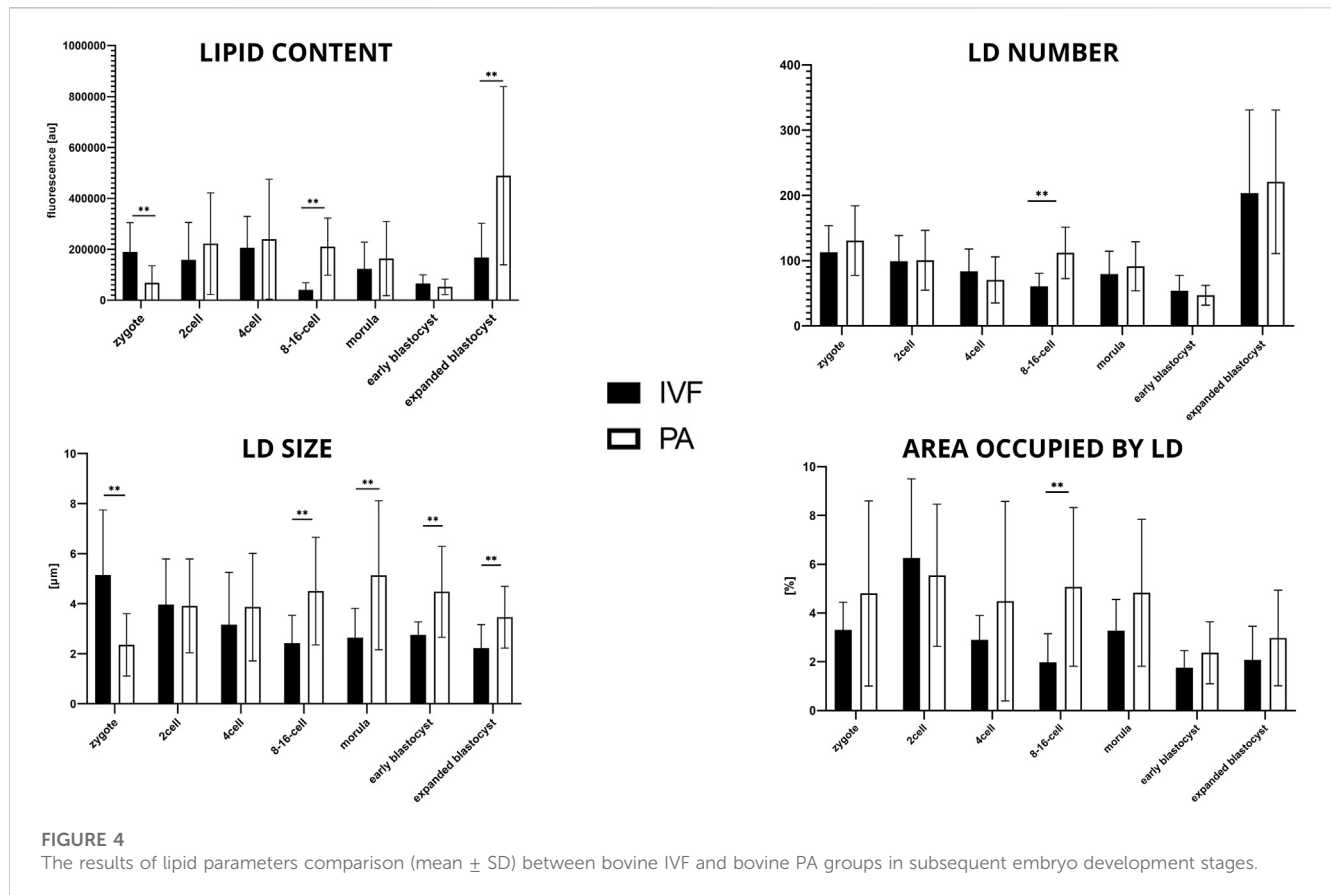
FIGURE 1 The diagram presents subsequent developmental stages of bovine IVF embryos, with lipid droplets parameters included. Each stage of development is compared to the one step before (2-cell vs. zygote, 4-cell vs. 2-cell, 8/16-cell vs. 4-cell, morula vs. 8/16-cell, early blastocyst vs. morula, expanded blastocyst vs. early blastocyst). The dark blue color of a box indicates significant drop of the parameter, whereas dark green—significant increase of the parameter. The light colors indicate up- or down- changes but not significant. The subsequent rows of the figure present: confocal 3D visualization of embryos, green dye—lipid droplets, blue dye—nuclei; Lipid content parameter mean value per slice $\pm$ SD; LD number parameter mean value per slice $\pm$ SD; LD size parameter mean value per slice $\pm$ SD; percentage LD area parameter mean value per slice $\pm$ SD. The logarithmic transformation of the values on the Y-axis has been applied.

**FIGURE 2**

The diagram presents subsequent developmental stages of bovine PA embryo development, with lipid droplets parameters included. Each stage of development is compared to the one step before (2-cell vs. zygote, 4-cell vs. 2-cell, 8/16-cell vs. 4-cell, morula vs. 8/16-cell, early blastocyst vs. morula, expanded blastocyst vs. early blastocyst). The dark blue color of a box indicates significant drop of the parameter, whereas dark green—significant increase of the parameter. The light colors indicate up- or down- changes but not significant. The subsequent rows of the figure present: confocal 3D visualization of embryos, green dye—lipid droplets, blue dye—nuclei; Lipid content parameter mean value per slice $\pm$ SD; LD number parameter mean value per slice $\pm$ SD; LD size parameter mean value per slice $\pm$ SD; percentage LD area parameter mean value per slice $\pm$ SD. The logarithmic transformation of the values on the Y-axis has been applied.

**FIGURE 3**

The diagram presents subsequent developmental stages of porcine PA embryo development, with lipid droplets parameters included. Each stage of development is compared to the one step before (2-cell vs. zygote, 4-cell vs. 2-cell, 8/16-cell vs. 4-cell, morula vs. 8/16-cell, early blastocyst vs. morula, expanded blastocyst vs. early blastocyst). The dark blue color of a box indicates significant drop of the parameter, whereas dark green—significant increase of the parameter. The light colors indicate up- or down- changes but not significant. The subsequent rows of the figure present: confocal 3D visualization of embryos, green dye—lipid droplets, blue dye—nuclei; Lipid content parameter mean value per slice ± SD; LD number parameter mean value per slice ± SD; LD size parameter mean value per slice ± SD; percentage LD area parameter mean value per slice ± SD. The logarithmic transformation of the values on the Y-axis has been applied.



expanded blastocyst. The gradual increase of LD number was observed from the zygote up to the expanded blastocyst stage which achieved the highest values.

3.4 Bovine IVF vs. bovine PA

The first noticeable difference between the two groups is the significantly lower level of lipid content and LD size in b.PA zygote stage ($p < 0.01$), while the LD number and the average area occupied by LD remain the same. Next, significantly lower values ($p < 0.01$) in b.IVF 8–16-cell embryos were observed in all analyzed parameters. The size of LDs increased from 8–16-cell stage embryos up to the blastocyst stage. The higher lipid content in b.PA expanded blastocyst ($p < 0.01$) corresponds with higher LD sizes ($p < 0.05$) when compared to b. IVF (Figure 4).

3.5 Bovine PA vs. porcine PA

Considering lipid content analysis at the zygote stage, the lipid level is similar between b.PA and p.PA. Embryos at the 2-cell and 8–16-cell stages as well as the morulas had significantly ($p < 0.01$) more lipids in b.PA group. The relation was opposite in the early and expanded blastocysts, where lipid content was significantly higher in the p.PA embryos ($p < 0.01$). Moreover, in b.PA group more lipid droplets were observed in the zygote, 2-cell and 8–16-cell

stages ($p < 0.01$) and likewise, it resulted in a significantly higher number of LD in p.PA blastocysts ($p < 0.01$). LD size was higher in all development stages of p.PA embryos. Moreover, except for the zygote and morula, the area occupied by LD was larger in the p.PA group (Figure 5).

3.6 ICM vs. entire blastocyst comparison

The measurements within expanded blastocysts regarding lipid content in the inner cell mass in relation to the total embryo have been performed. Results show that lipid content within the ICM was $51\% \pm 22\%$, $52\% \pm 16\%$ and $42\% \pm 23\%$ for b.IVF, b.PA, and p.PA respectively of total embryo lipid capacity (summarized in Table 2). There were no significant differences when the ICM parameters were compared between b.PA vs. p.PA and b.IVF vs. b.PA groups. Although there are differences between general lipid content in blastocyst (shown in comparisons described in paragraphs above), the ICM results indicate that in all groups lipids are distributed with the same pattern—nearly evenly between ICM and TE cell lines.

4 Discussion

Lipids are essential components of the cells since they participate in cellular membranes formation and many key processes such as cell division, differentiation or signaling cascades. Research has

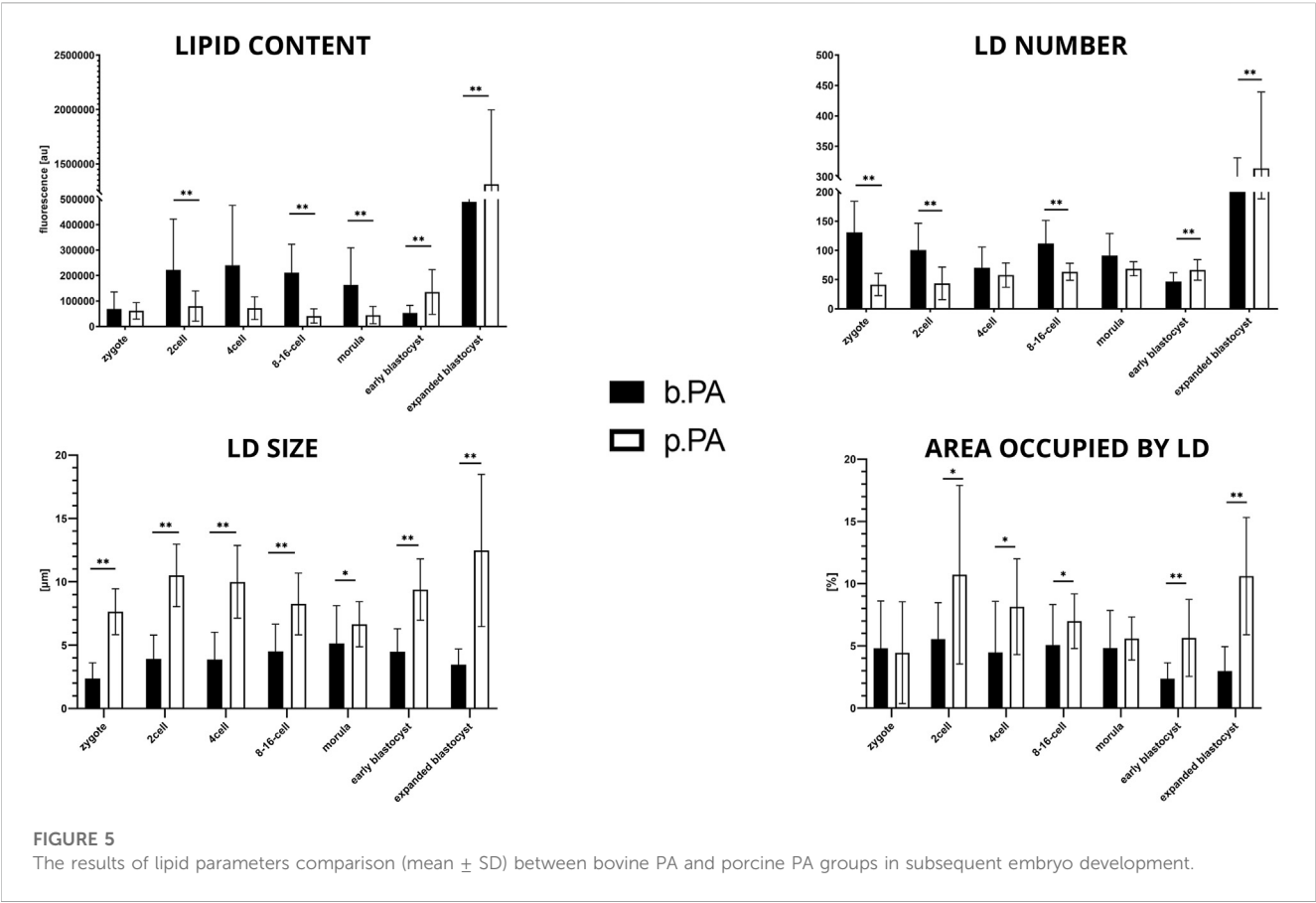
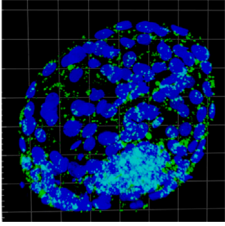
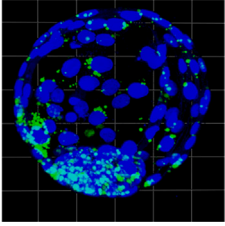
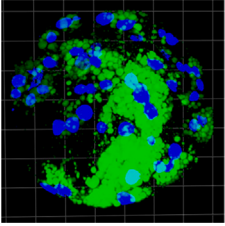


TABLE 2 The results of expanded blastocyst analysis with lipid content [%] in ICM in relation to the entire blastocyst; green dye–lipid droplets, blue dye–nuclei; ICM–inner cell mass, BL–blastocyst.

	b.IVF	b.PA	p.PA
Expanded blastocyst visualization			
Lipid content in ICM [au]	86,844 $\pm$ 67,481	215,483 $\pm$ 170,366	476,046 $\pm$ 321,139
Lipid content in ICM per entire blastocyst [%]	51 $\pm$ 22	52 $\pm$ 16	42 $\pm$ 23

shown that lipid metabolism and lipid droplet dynamics are regulated by a variety of factors. The alterations in lipid metabolism can result in oocyte developmental defects and reduced fertility as well as impaired embryo development (Shi and Sirard, 2022). Maintaining adequate levels of LDs is important both for oocytes and early embryos, even in mammalian species with low LDs number in the oocytes (Aizawa et al., 2019). A possible imbalance in lipid content can negatively affect not only lipid metabolism itself but also cellular homeostasis

which can lead to reduced embryo quality (Ibayashi et al., 2021). Therefore, we decided to characterize lipid droplets parameters within two mainly used large animal models–cattle and pigs, as well as, evaluate the impact of embryo genome origin (IVF vs. PA). In the presented study, we evaluated several lipid parameters (lipid content, lipid droplet number, lipid droplet size and area occupied by lipid droplets) and compared them among subsequent development stages of bovine *in vitro* preimplantation embryos. Among others, we noticed the lowest values of all analyzed

parameters at the 8–16-cells stage bovine embryos, which coincides with the time of bovine embryo genome activation. It has been previously suggested that EGA is in high energy demand due to large-scale gene transcription (Zhai et al., 2022). This hypothesis is supported by the transcriptomic results of Milazzotto et al. (2022), who showed increased expression of genes involved in TAGs catabolism at the 8-cell stage when compared to the earlier stage. Therefore, our lipid content observations might suggest that during bovine EGA strong TAGs catabolism takes place, which results in a decrease in lipid content, to produce a high amount of energy. Sudano et al. (2016) did not observe a decrease in the lipid content at the 8–16-cell stage (droplets stained with Nile Red), however, their analysis was performed with a simple fluorescence microscope and each embryo was analyzed only in the equatorial plane (Sudano et al., 2016). The present experiment was performed with confocal microscopy with a higher precision due to 3D embryo reconstruction. Therefore, to our knowledge, we are the first to show that along with high energy requirements and high glucose consumption, the bovine embryo also consumes lipids more intensively during EGA.

The second interesting outcome from bovine IVF embryos analysis was the significant increase of lipid droplets number in the expanded blastocyst stage, which suggests the demand for energy accumulation at this stage of development. It agrees with the results of Miazotto et al. (2022), who observed the upregulation of genes involved both in carbohydrate and lipid metabolism in blastocysts, including TGAs biosynthesis in bovine blastocysts. Moreover, glycolysis genes were not affected in blastocysts (Milazzotto et al., 2022). It is rather surprising since previously it has been suggested that energy production from carbohydrates is preferable at this stage of development (Leese, 2012). However, we suggest that lipids are still of high importance for the proper bovine embryo development at the blastocyst stage, despite the general switch into energy production mainly from glucose source (Leese, 2012). It might be related to the fact, that at the blastocyst stage intensive mitotic divisions take place, which requires the formation of membranes for new cells, for which lipids are required. Also, ICM/TE and blastocoel formation as well as further implantation is energy demanding (Ibayashi et al., 2021) hence embryos store LD intensively for further proper development. This hypothesis has been recently supported by the studies of Mau et al. (2022), who revealed accumulation of LDs around the time of implantation of mice embryos is necessary to support peri-implantation development.

Oocytes can be successfully activated without male gamete by inducing them to undergo multiple cleavage divisions, thus initiating embryonic development in the process of parthenogenesis. The developmental arrest of the parthenotes (parthenogenetically activated embryos) is due to changes in their genomic imprinting (Kirioukhova et al., 2018). In the present experiment, in bovine parthenogenetic embryos, we observe an increase of lipid content from the zygote to the 2-cell stage, followed by a decrease at the early blastocyst stage and a further increase in the expanded blastocyst. Therefore, no significant changes around the EGA process are observed and strong lipid catabolism is noticed only when blastocysts are formed. Also, the LD number significantly decreases at the early blastocyst stage and further increases at the expanded blastocyst stage, suggesting a possible energy demand at this stage of development.

To reveal the impact of parthenogenetic activation on lipid droplets parameters in preimplantation embryos, bovine PA embryos were compared with bovine IVF counterparts. There were three main observations: 1) b.PA zygotes have significantly fewer lipids ($p < 0.01$) than b.IVF; 2) b.PA embryos at the 8–16-cell stage have significantly higher values in all analyzed parameters than b.IVF ($p < 0.01$), and 3) b.PA expanding blastocysts contain significantly more lipids with a bigger size of lipid droplets when compared to b.IVF. According to the literature, both first cleavage and DNA synthesis occur earlier in bovine PA embryos than in IVF embryos (summarized by Gómez et al., 2009). Moreover, it was shown that parthenogenetic activation disturbs the total protein profiles of porcine zygotes (Gupta et al., 2009), which suggests possible substantial abnormalities in the basic metabolism. During standard fertilization, sperm induces degradation of MPF activity (a protein kinase that inhibits meiosis division) via repeated rises of calcium ion levels (Miao and Williams, 2012). In the PA protocols, chemical or physical agents induce this mechanism. We suggest that zygotes during parthenogenetic activation might reveal higher energy consumption due to the artificially induced processes. Surprisingly, the opposite situation is observed at the 8–16-cell stage, when significantly lower values are found for all lipid parameters in the IVF group compared to PA. Since this is a moment of bovine embryo genome activation, two explanations are possible. One is that b.IVF embryos, containing both maternal and paternal genetic material and undergoing demethylations of both, require more energy during this transition than parthenotes consisting of a duplicate set of an epigenetically imprinted maternal genome. Another hypothesis is that b.PA embryos are impaired with regard to the expression of selected genes controlling lipid metabolism (especially the ones related to lipolysis, which is a process of TAGs hydrolysis) because of only maternal methylation pattern. Due to the lack of other publications focused on this subject, it is highly interesting for further studies. In the present experiment, there is also observed significantly higher accumulation of lipids in b.PA blastocysts when compared to b.IVF counterparts. Studies on other species showed that parthenogenetic activation does not affect glucose metabolism in goat blastocysts (Ongeri and Krisher, 2001), whereas it dysregulates lipid metabolism (Pu et al., 2020). We also observed higher lipid content in PA blastocysts. All those observations might be due to the dysregulation of lipolysis processes in parthenogenetic embryos, which is however only a hypothesis.

The next goal of the present experiment is the analysis of lipid droplets parameters in the porcine parthenogenetic preimplantation embryos. We observe high variability between stages in every analyzed parameter. The most interesting is the significant decrease in lipid content at the 8–16-cell stage. In *in vivo* porcine embryos the EGA occurs during the 4-cell stage, yet the literature data points that under *in vitro* conditions, this transition is postponed to the next stage (Piliszek and Madeja, 2018). Therefore LD utilization at the 8–16 cell stage may be related to the intensive energy demand due to the embryo transcription onset. On the contrary, Sturme and Leese, 2003 (2003), as well as Romek et al. (2011) showed that there were no significant changes in triglyceride content within the developmental stages of the pig embryo. These authors suggested that this may be due to variation within the number of samples used in the experiments.

Hence, we propose that to some extent embryo genome activation may influence the observed decrease of parameters at the subsequent 8–16-cell stage in porcine PA embryos. It is also interesting to note that the highest parameter values in porcine embryos are observed in expanded blastocysts. This suggests a high demand for energy storage at this stage of porcine embryo development, similar to the bovine blastocysts. During blastocyst development specific cell differentiation occurs, ICM and TE cells are observed and the embryo is prepared for the process of implantation. As implantation is a demanding process (Downs et al., 2009; Wang et al., 2013), lipid storage appears to be energetically advantageous for the blastocyst. However, since lipid storage capacity varies between species, the potentially optimal amount of lipids required for proper development must also remain species-specific (Bradley and Swann, 2019).

In the present experiment, we also aimed to compare bovine and porcine embryos throughout the preimplantation development stages. According to the b.PA and p.PA embryos evaluation, the first noted data was the lack of differences in the lipid content between zygotes of both species. This is rather surprising since porcine oocytes have much higher lipid content than other farm animal species. It has been previously shown that LD number and morphology differ among porcine *in vivo*, *in vitro* and parthenogenetic embryos (Kikuchi et al., 2002). Therefore, it might be suggested that porcine zygotes utilize lipids more intensively than bovine ones, which results in equal lipid content at this stage of development. Next, we observe lower lipid content in porcine PA embryos when compared to bovine ones between 2-cell and morula stages. However, at the same time of development, porcine embryos are characterized by higher LD size and area occupied by LD. Therefore, in our opinion, this part of the results indicates variable individual characteristics of lipid droplets between these two species, the origin of which is difficult to explain based on the present experiment. The opposite results are shown in the early and expanded blastocysts, where higher lipid parameters are observed in porcine embryos, which is in agreement with the results of Kajdasz et al. (2020). Furthermore, their RNA-seq results showed the upregulation of genes related to glucose metabolism as a preferable source of energy for porcine PA blastocysts unlike bovine blastocysts (Kajdasz et al., 2020). It is therefore suggested that porcine PA blastocysts, similarly to bovine, switch partially to glucose metabolism, however they still strongly store lipids without excessive utilization. The putative role of this process is however unknown. Another result that draw our attention was the size and the number of lipid droplets. Porcine LD tend to be bigger but fewer compared to bovines. We suspect that this is a species-specific trait, since similar data have been previously published on intracellular LD of porcine (Lee et al., 2019) and bovine (Lipinska et al., 2021) oocytes.

During the preimplantation embryo development, the very first differentiation events occur already around the morula stage and continue during the blastocyst stage, when the inner cell mass and trophectoderm are formed (Piliszek and Madeja, 2018). Since both cell lines have diverse functions, their metabolic demand also differs. The TE cells have higher pyruvate and lower glucose consumption, while in ICM a contradictory effect is observed (Gopichandran and Leese, 2003). Being aware of the differences in carbohydrate metabolism, we decided to analyze the lipid content within ICM in relation to the whole blastocyst. In all analyzed cases (b.IVF, b.PA, p.PA) we observed the same pattern—lipids were allocated equally between ICM and TE. It is however known that

the total area of the cells is not evenly divided between these two lines, because ICM covers only a third part of the blastocyst area (Gopichandran and Leese, 2003). We suggest that ICM cells store lipids more intensely due to their pluripotency and their further properties (Diamante and Martello, 2022). Moreover, lipids that take part in signaling cascades (e.g., arachidonic acid) are of the highest importance for pluripotent cells development (Yanes et al., 2010). The lack of differences between analyzed groups (b.IVF vs. b.PA and b.PA vs. p.PA) can be explained by the same molecular mechanism (CDX2 and OCT-4 expression) that is involved and essential in the ICM/TE differentiation in both bovine and porcine embryos (Emura et al., 2016; Sakurai et al., 2016).

5 Conclusion

In the presented study, we analyzed porcine and bovine subsequent preimplantation embryo stages in terms of species-specificity and genome-origin possible impact on lipid metabolism and we have shown multiple differences. Lipid parameters in the IVF vs. PA bovine embryos differ at the most crucial moments of embryonic development (zygote, 8–16-cell, blastocyst), indicating possible dysregulations of lipid metabolism in PA embryos. When bovine vs. porcine species are compared, we observe higher lipid content around the EGA stage and lower lipid content at the blastocyst stage for bovine embryos, which indicates different demands for energy depending on the species. We conclude that lipid droplets parameters significantly differ among developmental stages and between the studied species. Data suggest, that these parameters may be also related to the factors of genome origin. Moreover, the observed pattern of changes during preimplantation development may be applied as one of the indicators of embryo quality and developmental competence under variable *in vitro* culture conditions.

Data availability statement

The original contributions presented in the study are included in the article/[Supplementary Material](#), further inquiries can be directed to the corresponding author.

Ethics statement

Ethical review and approval was not required for the animal study because the biological material (bovine and porcine ovaries) was obtained from commercial slaughterhouses after routine slaughter. All procedures were performed by the guidelines of the National Ethics Committee for Animal Research (Ministry of Science and Higher Education, Poland).

Author contributions

This study was conceptualized by EW and PP, IVF/PA experiments were performed by PL, EW, and PP, microscopic,

computer, and statistical analysis were performed by PL, manuscript was prepared by PL, EW, and PP.

Funding

This work was founded with the Young Scientist Research Grant 2022 (Grant number: 506.534.05.00) provided by the Faculty of Veterinary Medicine, Poznan University of Life Sciences. The cost of Open Access publication was covered by the Society for Biology of Reproduction in Poland.

Acknowledgments

The authors acknowledge Joanna Lechtanska for laboratory supervision, Zofia E. Madeja for confocal microscope analysis support, Ewa Sell-Kubiak for statistical support and Jakub Wozniak for statistical data visualization help.

Conflict of interest

The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

References

- Aizawa, R., Ibayashi, M., Tatsumi, T., Yamamoto, A., Kokubo, T., Miyasaka, N., et al. (2019). Synthesis and maintenance of lipid droplets are essential for mouse preimplantation embryonic development. *Dev. Camb.* 22, 146. doi:10.1242/dev.181925
- Bischoff, S. R., Tsai, S., Hardison, N., Motsinger-Reif, A. A., Freking, B. A., Nonneman, D., et al. (2009). Characterization of conserved and nonconserved imprinted genes in swine. *Biol. Reproduction* 81 (5), 906–920. doi:10.1095/biolreprod.109.078139
- Bradley, J., Pope, I., Masia, F., Sanusi, R., Langbein, W., Swann, K., et al. (2016). Quantitative imaging of lipids in live mouse oocytes and early embryos using CARS microscopy. *Dev. Camb.* 143 (12), 2238–2247. doi:10.1242/dev.129908
- Bradley, J., and Swann, K. (2019). Mitochondria and lipid metabolism in mammalian oocytes and early embryos. *Int. J. Dev. Biol.* 63 (3–5), 93–103. doi:10.1387/ijdb.180355ks
- Chi, F., Sharpley, M. S., Nagaraj, R., Roysen, S., and Banerjee, U. (2020). Glycolysis-independent glucose metabolism distinguishes TE from ICM fate during mammalian embryogenesis. *Dev. Cell* 53 (1), 9–26. doi:10.1016/j.devcel.2020.02.015
- De Lima, C. B., Ferreira, C. R., Milazzotto, M. P., Sobreira, T. J. P., Vireque, A. A., and Cooks, R. G. (2018). Comprehensive lipid profiling of early stage oocytes and embryos by MRM profiling. *J. Mass Spectrom.* 53 (12), 1247–1252. doi:10.1002/jms.4301
- Deutsch, D. R., Fröhlich, T., Otte, K. A., Beck, A., Habermann, F. A., Wolf, E., et al. (2014). Stage-specific proteome signatures in early bovine embryo development. *J. Proteome Res.* 13 (10), 4363–4376. doi:10.1021/pr500550t
- Diamante, L., and Martello, G. (2022). Metabolic regulation in pluripotent stem cells. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 75, 101923. doi:10.1016/j.gde.2022.101923
- Downs, S. M., Mosey, J. L., and Klinger, J. (2009). Fatty acid oxidation and meiotic resumption in mouse oocytes. *Mol. Reproduction Dev.* 76 (9), 844–853. doi:10.1002/MRD.21047
- Emura, N., Sakurai, N., Takahashi, K., Hashizume, T., and Sawai, K. (2016). OCT-4 expression is essential for the segregation of trophoblast lineages in porcine preimplantation embryos. *J. Reproduction Dev.* 62 (4), 401–408. doi:10.1262/JRD.2016-040
- Ferguson, E. M., and Leese, H. J. (1999). Triglyceride content of bovine oocytes and early embryos. *J. Reproduction Fertil.* 116 (2), 373–378. doi:10.1530/JRF.0.1160373
- Ghanem, N., Ha, A. N., Fakruzzaman, M., Bang, J. i., Lee, S. C., and Kong, I. K. (2014). Differential expression of selected candidate genes in bovine embryos produced invitro and cultured with chemicals modulating lipid metabolism. *Theriogenology* 82 (2), 238–250. doi:10.1016/j.theriogenology.2014.03.024
- Gómez, E., Gutiérrez-Adán, A., Díez, C., Bermejo-Alvarez, P., Muñoz, M., Rodríguez, A., et al. (2009). Biological differences between *in vitro* produced bovine embryos and parthenotes. *Reproduction* 137 (2), 285–295. doi:10.1530/REP-08-0220
- Gopichandran, N., and Leese, H. J. (2003). Metabolic characterization of the bovine blastocyst, inner cell mass, trophoblast and blastocoel fluid. *Reprod. Camb. Engl.* 126 (3), 299–308. doi:10.1530/REP.0.1260299
- Gupta, M. K., Jung, M. J., Jin, W. J., Sang, J. U., Kwang, P. K., and Hoon, T. L. (2009). Proteomic analysis of parthenogenetic and *in vitro* fertilized porcine embryos. *Proteomics* 9 (10), 2846–2860. doi:10.1002/PMIC.200800700
- Ibayashi, M., Aizawa, R., Mitsui, J., and Tsukamoto, S. (2021). Homeostatic regulation of lipid droplet content in mammalian oocytes and embryos. *Reproduction* 162 (6), R99–R109. doi:10.1530/REP-21-0238
- Janati Idrissi, S., le Bourhis, D., Lefevre, A., Emond, P., le Berre, L., Desnoës, O., et al. (2021). Lipid profile of bovine grade-1 blastocysts produced either *in vivo* or *in vitro* before and after slow freezing process. *Sci. Rep.* 11 (1), 11618. doi:10.1038/s41598-021-90870-8
- Kajdasz, A., Warzych, E., Derebecka, N., Madeja, Z. E., Lechniak, D., Wesoly, J., et al. (2020). Lipid stores and lipid metabolism associated gene expression in porcine and bovine parthenogenetic embryos revealed by fluorescent staining and rna-seq. *Int. J. Mol. Sci.* 21 (18), 6488–6513. doi:10.3390/ijms21186488
- Kikuchi, K., Ekwall, H., Tienthai, P., Kawai, Y., Noguchi, J., Kaneko, H., et al. (2002). Morphological features of lipid droplet transition during porcine oocyte fertilisation and early embryonic development to blastocyst *in vivo* and *in vitro*. *Zygote* 10 (4), 355–366. doi:10.1017/S0967199402004100
- Kirioukhova, O., Shah, J. N., Larsen, D. S., Tayyab, M., Mueller, N. E., Govind, G., et al. (2018). Aberrant imprinting may underlie evolution of parthenogenesis. *Sci. Rep.* 8 (1), 10626. doi:10.1038/s41598-018-27863-7
- Kure-Bayashi, S., Miyake, M., Okada, K., and Kato, S. (2000). Successful implantation of *in vitro*-matured, electro-activated oocytes in the pig. *Theriogenology* 53 (5), 1105–1119. doi:10.1016/S0093-691X(00)00256-9
- Lee, D. K., Choi, K. H., Hwang, J. Y., Oh, J. N., Kim, S. H., and Lee, C. K. (2019). Stearoyl-coenzyme A desaturase 1 is required for lipid droplet formation in pig embryo. *Reprod. Camb. Engl.* 157 (3), 235–243. doi:10.1530/REP-18-0556

Publisher's note

All claims expressed in this article are solely those of the authors and do not necessarily represent those of their affiliated organizations, or those of the publisher, the editors and the reviewers. Any product that may be evaluated in this article, or claim that may be made by its manufacturer, is not guaranteed or endorsed by the publisher.

Supplementary material

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcell.2023.1187832/full#supplementary-material>

SUPPLEMENTARY TABLE S1

Summarized total results of statistical analysis, where all stages of bovine IVF embryos were compared to each other. There are shown P values of particular comparisons. ns—not significant.

SUPPLEMENTARY TABLE S2

Summarized total results of statistical analysis, where all stages of bovine PA embryos were compared to each other. There are shown P values of particular comparisons. ns—not significant.

SUPPLEMENTARY TABLE S3

Summarized total results of statistical analysis, where all stages of porcine PA embryos were compared to each other. There are shown P values of particular comparisons. ns—not significant.

- Leese, H. J. (2012). Metabolism of the preimplantation embryo: 40 years on. *Reprod. Camb. Engl.* 143 (4), 417–427. doi:10.1530/REP-11-0484
- Li, X., Zou, C., Li, M., Fang, C., Li, K., Liu, Z., et al. (2021). Transcriptome analysis of *in vitro* fertilization and parthenogenesis activation during early embryonic development in pigs. *Genes* 12 (10), 1461. doi:10.3390/genes12101461
- Lipinska, P., Sell-Kubiak, E., Pawlak, P., Madeja, Z. E., and Warzych, E. (2021). Response of bovine cumulus-oocytes complexes to energy pathway inhibition during *in vitro* maturation. *Genes* 12 (6), 838. doi:10.3390/genes12060838
- Mau, K. H. T., Karimlou, D., Barneda, D., Brochard, V., Royer, C., Leeke, B., et al. (2022). Dynamic enlargement and mobilization of lipid droplets in pluripotent cells coordinate morphogenesis during mouse peri-implantation development. *Nat. Commun.* 13 (1), 3861. doi:10.1038/s41467-022-31323-2
- Melo-Sterza, F. de A., and Poehland, R. (2021). Lipid metabolism in bovine oocytes and early embryos under *in vivo*, *in vitro*, and stress conditions. *Int. J. Mol. Sci.* 22, 3421. doi:10.3390/ijms22073421
- Miao, Y. L., and Williams, C. J. (2012). Calcium signaling in mammalian egg activation and embryo development: The influence of subcellular localization. *Mol. Reproduction Dev.* 79 (11), 742–756. doi:10.1002/MRD.22078
- Milazzotto, M. P., de Lima, C. B., da Fonseca, A. M., dos Santos, E. C., and Ispada, J. (2020). Erasing gametes to write blastocysts: Metabolism as the new player in epigenetic reprogramming. *Anim. Reprod.* 17 (3), e20200015. doi:10.1590/1984-3143-AR2020-0015
- Milazzotto, M. P., Goissis, M. D., Chitwood, J. L., Annes, K., Soares, C. A., Ispada, J., et al. (2016). Early cleavages influence the molecular and the metabolic pattern of individually cultured bovine blastocysts. *Mol. Reproduction Dev.* 83 (4), 324–336. doi:10.1002/mrd.22619
- Milazzotto, M. P., Noonan, M. J., and de Almeida Monteiro Melo Ferraz, M. (2022). Mining RNAseq data reveals dynamic metaboloepigenetic profiles in human, mouse and bovine pre-implantation embryos. *IScience* 25 (3), 103904. doi:10.1016/j.isci.2022.103904
- Onger, E. M., and Krisher, R. L. (2001). Glucose and pyruvate metabolism of preimplantation goat blastocysts following *in vitro* fertilization and parthenogenetic activation. *Cloning Stem Cells* 3 (3), 115–123. doi:10.1089/153623001753205070
- Pawlak, P., Malyszka, N., Szczerbal, I., and Kolodziejewski, P. (2020). Fatty acid induced lipolysis influences embryo development, gene expression and lipid droplet formation in the porcine cumulus cells. *Biol. Reproduction* 103 (1), 36–48. doi:10.1093/BIOLRE/IOAA045
- Pawlak, P., Warzych, E., Cieslak, A., Malyszka, N., Maciejewska, E., Madeja, Z. E., et al. (2018). The consequences of porcine IVM medium supplementation with follicular fluid become reflected in embryo quality, yield and gene expression patterns. *Sci. Rep.* 8 (1), 15306. doi:10.1038/S41598-018-33550-4
- Piliszek, A., and Madeja, Z. E. (2018). Pre-implantation development of domestic animals. *Curr. Top. Dev. Biol.* 128, 267–294. doi:10.1016/bs.ctdb.2017.11.005
- Pu, L., Shahzad, Q., Chen, F., Yao, S., Tang, Y., Chen, D., et al. (2020). Proteomic analysis demonstrates that parthenogenetically activated swamp buffalo embryos have dysregulated energy metabolism. *Reproduction Domest. Animals = Zuchtthygiene* 55 (12), 1764–1773. doi:10.1111/RDA.13838
- Romek, M., Gajda, B., Krzysztofowicz, E., Kepczynski, M., and Smorag, Z. (2011). New technique to quantify the lipid composition of lipid droplets in porcine oocytes and pre-implantation embryos using Nile Red fluorescent probe. *Theriogenology* 75 (1), 42–54. doi:10.1016/J.THERIOGENOLOGY.2010.06.040
- Sakurai, N., Takahashi, K., Emura, N., Fujii, T., Hirayama, H., Kageyama, S., et al. (2016). The necessity of OCT-4 and CDX2 for early development and gene expression involved in differentiation of inner cell mass and trophectoderm lineages in bovine embryos. *Cell. Reprogr.* 18 (5), 309–318. doi:10.1089/CELL.2015.0081
- Shi, M., and Sirard, M. A. (2022). Metabolism of fatty acids in follicular cells, oocytes, and blastocysts. *Reproduction Fertil.* 3 (2), R96–R108. doi:10.1530/RAF-21-0123
- Sturmey, R. G., and Leese, H. J. (2003). Energy metabolism in pig oocytes and early embryos. *Reproduction* 126 (2), 192–204. doi:10.1530/rep.0.1260197
- Sudano, M. J., Paschoal, D. M., da Silva Rascado, T., Magalhães, L. C. O., Crocomo, L. F., de Lima-Neto, J. F., et al. (2011). Lipid content and apoptosis of *in vitro*-produced bovine embryos as determinants of susceptibility to vitrification. *Theriogenology* 75 (7), 1211–1220. doi:10.1016/j.theriogenology.2010.11.033
- Sudano, M. J., Rascado, T. D. S., Tata, A., Belaz, K. R. A., Santos, V. G., Valente, R. S., et al. (2016). Lipidome signatures in early bovine embryo development. *Theriogenology* 86 (2), 472–484. e1. doi:10.1016/j.theriogenology.2016.03.025
- Wang, H., Zhang, S., Lin, H., Kong, S., Wang, S., Wang, H., et al. (2013). Physiological and molecular determinants of embryo implantation. *Mol. Aspects Med.* 34 (5), 939–980. doi:10.1016/j.mam.2012.12.011
- Warzych, E., Pawlak, P., Lechniak, D., and Madeja, Z. E. (2020). WNT signalling supported by MEK/ERK inhibition is essential to maintain pluripotency in bovine preimplantation embryo. *Dev. Biol.* 463 (1), 63–76. doi:10.1016/J.YDBIO.2020.04.004
- Yanes, O., Clark, J., Wong, D. M., Patti, G. J., Sánchez-Ruiz, A., and Benton, H. P. (2010). Metabolic oxidation regulates embryonic stem cell differentiation. *Nat. Chem. Biol.* 6 (6), 411–417. doi:10.1038/nchembio.364
- Zhai, Y., Yu, H., An, X., Zhang, Z., Zhang, M., Zhang, S., et al. (2022). Profiling the transcriptomic signatures and identifying the patterns of zygotic genome activation – A comparative analysis between early porcine embryos and their counterparts in other three mammalian species. *BMC Genomics* 23 (1), 772. doi:10.1186/s12864-022-09015-4

Supplementary File 1
Table 1.

Lipid content		Zygote	2cell	4cell	8-16 cell	Morula	Early blastocyst	Expanded blastocyst
	Zygote	X	ns	ns	0.01	0.01	0.01	ns
	2cell	ns	x	ns	0.01	ns	0.05	ns
	4cell	ns	ns	x	0.01	0.01	0.01	ns
	8-16-cell	0.01	0.01	0.01	x	0.01	ns	0.01
	Morula	0.01	ns	0.01	0.01	x	ns	ns
	Early blastocyst	0.01	0.05	0.01	ns	ns	x	ns
	Expanded blastocyst	ns	ns	ns	0.01	ns	ns	x
LD number		Zygote	2cell	4cell	8-16 cell	Morula	Early blastocyst	Expanded blastocyst
	Zygote	x	ns	0.05	0.01	0.05	0.01	ns
	2cell	ns	x	ns	0.01	0.05	0.01	0.05
	4cell	0.05	ns	x	ns	ns	0.01	0.01
	8-16-cell	0.01	0.01	ns	x	ns	ns	0.01
	Morula	0.01	0.05	ns	ns	x	0.01	0.01
	Early blastocyst	0.01	0.01	0.01	ns	0.01	x	0.01
	Expanded blastocyst	ns	0.05	0.01	0.01	0.01	0.01	x
LD size		Zygote	2cell	4cell	8-16 cell	Morula	Early blastocyst	Expanded blastocyst
	Zygote	x	ns	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01
	2cell	ns	x	0.05	0.01	0.01	0.05	0.01
	4cell	0.01	0.05	x	ns	ns	ns	ns
	8-16-cell	0.01	0.01	ns	x	ns	ns	ns
	Morula	0.01	0.01	ns	ns	x	ns	ns
	Early blastocyst	0.01	0.05	ns	ns	ns	x	ns
	Expanded blastocyst	0.01	0.01	ns	ns	ns	ns	x
LD area %		Zygote	2cell	4cell	8-16 cell	Morula	Early blastocyst	Expanded blastocyst
	Zygote	x	ns	ns	0.01	0.05	0.01	ns
	2cell	ns	x	0.01	0.01	0.05	0.01	0.01
	4cell	ns	0.01	x	0.01	ns	0.01	0.05
	8-16-cell	0.01	0.01	0.01	x	0.05	ns	0.01
	Morula	ns	0.05	ns	0.05	x	0.05	ns
	Early blastocyst	0.01	0.01	0.05	ns	0.05	x	0.01
	Expanded blastocyst	ns	0.01	0.05	0.01	ns	0.01	x

Supplementary File 2
Table 2.

Lipid content		Zygote	2cell	4cell	8-16 cell	Morula	Early blastocyst	Expanded blastocyst
	Zygote	x	0.01	0.05	0.01	0.01	ns	0.01
LD number	2cell	0.01	x	ns	ns	ns	0.01	0.01
	4cell	0.05	ns	x	ns	ns	0.05	0.01
LD size	8-16-cell	0.01	ns	ns	x	ns	0.01	0.05
	Morula	0.01	ns	ns	ns	x	0.01	0.01
LD area %	Early blastocyst	ns	0.01	0.05	0.01	0.01	x	0.01
	Expanded blastocyst	0.01	0.01	0.01	0.05	0.01	0.01	x
LD area % Zygote	Zygote	x	ns	0.01	ns	0.05	0.01	0.05
	2cell	ns	x	ns	ns	ns	0.01	0.01
LD area % 2cell	4cell	0.01	ns	x	0.01	ns	ns	0.01
	8-16-cell	ns	ns	0.01	x	ns	0.01	0.01
LD area % 4cell	Morula	0.05	ns	ns	ns	x	0.05	0.01
	Early blastocyst	0.01	0.01	ns	0.01	0.05	x	0.01
LD area % 8-16-cell	Expanded blastocyst	0.05	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	x
	Zygote	x	0.01	0.01	0.05	0.01	0.01	0.01
LD area % Morula	2cell	0.01	x	ns	ns	ns	ns	ns
	4cell	0.01	ns	x	ns	ns	ns	ns
LD area % Early blastocyst	8-16-cell	0.05	ns	ns	x	ns	ns	ns
	Morula	0.01	ns	ns	ns	x	ns	ns
LD area % Expanded blastocyst	Early blastocyst	0.01	ns	ns	ns	ns	x	ns
	Expanded blastocyst	0.01	ns	ns	ns	ns	ns	x
LD area % Zygote	Zygote	x	ns	ns	ns	ns	0.05	ns
	2cell	ns	x	0.05	ns	ns	0.01	0.01
LD area % 2cell	4cell	ns	0.05	x	ns	ns	ns	0.01
	8-16-cell	ns	ns	ns	x	ns	0.01	0.05
LD area % 4cell	Morula	ns	ns	ns	ns	x	ns	0.01
	Early blastocyst	0.05	0.01	ns	0.01	ns	x	ns
LD area % 8-16-cell	Expanded blastocyst	ns	0.01	0.01	0.05	0.01	ns	x
	Zygote	x	0.01	0.01	0.05	0.01	0.01	0.01
LD area % Morula	2cell	0.01	x	ns	ns	ns	0.01	0.01
	4cell	0.01	ns	x	0.01	ns	ns	0.01
LD area % Early blastocyst	8-16-cell	ns	ns	0.01	x	ns	0.01	0.01
	Morula	0.05	ns	ns	ns	x	0.05	0.01
LD area % Expanded blastocyst	Early blastocyst	0.01	0.01	ns	0.01	0.05	x	0.01
	Expanded blastocyst	0.05	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	x

Supplementary File 3
Table 3.

Lipid content		Zygote	2cell	4cell	8-16 cell	Morula	Early blastocyst	Expanded blastocyst
LD number	Zygote	x	ns	ns	ns	ns	0.01	0.01
	2cell	ns	x	ns	0.05	0.05	0.01	0.01
	4cell	ns	ns	x	0.05	0.05	0.01	0.01
	8-16-cell	ns	0.05	0.05	x	ns	0.01	0.01
	Morula	ns	0.05	0.05	ns	x	0.01	0.01
	Early blastocyst	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	x	0.01
	Expanded blastocyst	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	x
		Zygote	2cell	4cell	8-16 cell	Morula	Early blastocyst	Expanded blastocyst
	Zygote	x	ns	0.05	0.01	0.01	0.01	0.01
	2cell	ns	x	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01
	4cell	0.05	0.01	x	ns	ns	ns	0.01
	8-16-cell	0.01	0.01	ns	x	ns	ns	0.01
	Morula	0.01	0.01	ns	ns	x	ns	0.01
	Early blastocyst	0.01	0.01	ns	ns	ns	x	0.01
	Expanded blastocyst	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	x
		Zygote	2cell	4cell	8-16 cell	Morula	Early blastocyst	Expanded blastocyst
LD size	Zygote	x	0.01	0.01	ns	ns	0.05	ns
	2cell	0.01	x	ns	0.01	0.01	ns	ns
	4cell	0.01	ns	x	0.05	0.01	ns	ns
	8-16-cell	ns	0.01	0.05	x	0.05	ns	0.05
	Morula	ns	0.01	0.01	0.05	x	0.01	ns
	Early blastocyst	0.05	ns	ns	ns	0.01	x	0.01
	Expanded blastocyst	ns	ns	ns	0.05	ns	0.01	x
		Zygote	2cell	4cell	8-16 cell	Morula	Early blastocyst	Expanded blastocyst
	LD area % Zygote	x	0.01	0.01	0.01	ns	ns	0.01
		2cell	0.01	x	ns	0.01	0.01	ns
	4cell	0.01	ns	x	ns	0.05	0.05	ns
	8-16-cell	0.01	ns	ns	x	ns	ns	0.05

Supplementary File 3
Table 3.

Morula	ns	0.01	0.05	ns	x	ns	0.01
Early blastocyst	ns	0.01	0.05	ns	ns	x	0.01
Expanded blastocyst	0.01	ns	ns	0.05	0.01	0.01	x

Załącznik 2

Imię i nazwisko współautora pracy: **Ewelina Warzych-Plejer**

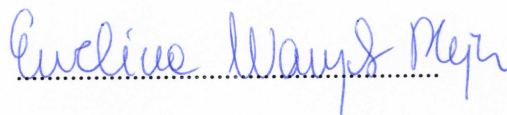
Afiliacja: **Katedra Genetyki i Podstaw Hodowli Zwierząt, Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu**

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy: **Paulina Lipinska, Piotr Pawlak, Ewelina Warzych, 2023, „Species and embryo genome origin affect lipid droplets in preimplantation embryos” Front Cell Dev Biol, 11:1187832, doi: 10.3389/fcell.2023.1187832**, mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na: * stworzeniu koncepcji i przygotowaniu projektu badań, nadzorze nad częścią doświadczalną, pomocy w interpretacji wyników, wiodącym współautorstwie w opracowaniu manuskryptu.

Data9.05.2025.....

Podpis



- * wpisać właściwe: autorstwo koncepcji, przygotowanie projektu badań, opracowanie krytycznego przeglądu literatury, opracowanie założeń i metod, przeprowadzenie badań, w tym zbieranie danych, analiza wyników, interpretacja wyników i sformułowanie wniosków, obliczenia statystyczne, opracowanie grafik, opracowanie manuskryptu, inne (należy wskazać)

Załącznik 2

Imię i nazwisko współautora pracy: **Piotr Pawlak**

Afiliacja: **Katedra Genetyki i Podstaw Hodowli Zwierząt, Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu**

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy: **Paulina Lipinska, Piotr Pawlak, Ewelina Warzych, 2023, „Species and embryo genome origin affect lipid droplets in preimplantation embryos” Front Cell Dev Biol, 11:1187832, doi: 10.3389/fcell.2023.1187832**, mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na: * uczestniczeniu w części doświadczalnej związanej z pozyskiwaniem zarodków partenogenetycznych, wsparciu w interpretacji wyników i opracowaniu manuskryptu.

Data13.05.2025.....

Podpis.....

- * wpisać właściwe: autorstwo koncepcji, przygotowanie projektu badań, opracowanie krytycznego przeglądu literatury, opracowanie założeń i metod, przeprowadzenie badań, w tym zbieranie danych, analiza wyników, interpretacja wyników i sformułowanie wniosków, obliczenia statystyczne, opracowanie grafik, opracowanie manuskryptu, inne (należy wskazać)