

УДК 636.2:591.465.12:612.621.31:57.085.2
DOI: 10.25687/1996-6733.prodanimbiol.2022.1.29-34

ВОЗДЕЙСТВИЕ ГИПОКСАНТИНА В НИЗКИХ КОНЦЕНТРАЦИЯХ НА СОЗРЕВАНИЕ И ОПЛОДОТВОРЕНИЕ ООЦИТОВ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА *in vitro*

Сметанина И.Г.

*ВНИИ физиологии, биохимии и питания животных - филиал ФИЦ
животноводства - ВИЖ им. Л.К. Эрнста, Боровск Калужской обл.,
Российская Федерация*

Исследование действия специфических веществ, участвующих в процессах регуляции мейоза, представляет большой практический и теоретический интерес. Одним из таких веществ является гипоксантин (Гк) – один из компонентов фолликулярной жидкости. В проведенных ранее предварительных исследованиях процессов созревания ооцитов крупного рогатого скота *in vitro* было показано, что при снижении концентрации Гк в среде может увеличиваться количество ооцитов, возобновляющих мейоз и достигающих стадии метафазы 2 (М2). Эти результаты указывали на возможный ингибирующий эффект Гк. Цель данной работы – изучение влияния сниженной концентрации Гк в культуральной среде на способность ооцитов крупного рогатого скота к достижению стадии метафазы 2 и оплодотворению *in vitro*. Показано, что введение экзогенного гипоксантина даже в низкой концентрации (0.06 мМ) в не содержащую гипоксантин - безбелковую среду созревания МЕМ-alfa, дополненную 1 мкг/мл фолликулостимулирующего гормона, существенно снижает процент ооцитов, достигших стадии метафазы 2 (69% в контроле и 43% в опыте, $P < 0.001$), и процент пенетрированных и нормально оплодотворённых ооцитов (63.3 и 43.3% в контроле, 43.2 и 23.9% в опыте, $P < 0.05$). Полученные данные могут иметь практическое значение при разработке коммерческих сред для созревания *in vitro* ооцитов млекопитающих, включая человека.

Ключевые слова: ооциты крупного рогатого скота, созревание in vitro, метафаза 2, оплодотворение, фолликулостимулирующий гормон, гипоксантин

Проблемы биологии продуктивных животных, 2022, 1: 29-34

Введение

Созревание яйцеклеток млекопитающих *in vitro* является одним из начальных этапов биотехнологии получения жизнеспособных эмбрионов для их дальнейшего изучения или пересадки с целью рождения жизнеспособного потомства. Эта технология уже достаточно широко используется для сельскохозяйственных животных и находит все большее применение в области вспомогательных репродуктивных технологий человека. Вместе с тем сама модель созревающих вне организма яйцеклеток позволяет изучать механизмы их созревания и роль различных факторов, влияющих на процесс созревания, что в свою очередь способствует совершенствованию культуральных сред и оптимизации условий культивирования, повышая эффективность технологии.

Чрезвычайно важным при этом, очевидно, является изучение процесса созревания ооцитов у различных видов млекопитающих. Поскольку сопоставление данных, полученных на разных видах, позволит глубже понять фундаментальные механизмы раннего развития млекопитающих.

В то же время, использование в качестве экспериментальных моделей яйцеклеток различных видов даёт возможность вносить усовершенствования в технологии, которые могут оказаться применимы и для яйцеклеток и эмбрионов человека. Так, например, согласно данным различных лабораторий, показано, что созревающие ооциты крупного рогатого скота могут быть

использованы как надёжная модель для скрининга токсичных для эмбрионов человека агентов (Lazzari et al., 2008; Luciano et al., 2010; Beker van Woudenberg et al., 2012; Santos et al., 2014).

Исследование действия различных специфических молекул, которые могут участвовать в механизмах регуляции мейоза, представляет большой практический и теоретический интерес. Одним из таких веществ является гипоксантин (Гк) – компонент фолликулярной жидкости. Показано, что Гк поддерживает целостность базальной мембраны фолликулов и в концентрации 4 мМ положительно влияет на морфологию культивируемых ооцитов крупного рогатого скота, сохраняя их при этом на стадии зародышевого пузырька. Но ингибирование ядерного созревания обратимо (Senbon, Miyano, 2002). Ранее было показано, что концентрация Гк в фолликулярной жидкости коз снижается в процессе развития фолликул с 1.16 мМ в фолликулах диаметром не более 0.5 мм до 0.45 мМ в фолликулах диаметром от 5 мм, т.е. Гк обратимо блокировал мейоз, после чего ооциты коз были способны к нормальному ядерному созреванию и активации (Ma et al., 2003).

Гипоксантин является компонентом многих культуральных сред, используемых и для созревания *in vitro* яйцеклеток млекопитающих; он входит в состав первой коммерческой среды для созревания ооцитов человека (MediCult IVM System, Дания). Состав среды культивирования может влиять на созревание ооцитов крупного рогатого скота *in vitro* (Сметанина и др., 2000), при этом все исследованные среды (DMEM, TCM-199, Ham'F-10, Ham'F-12) отличались друг от друга по содержанию Гк – промежуточного продукта катаболизма пуриновых оснований. В проведенных экспериментах прослеживалась определённая тенденция – чем ниже концентрация Гк в среде, тем большая доля ооцитов возобновляет мейоз и достигает стадии метафазы 2 (М2). Полученные нами результаты указывали на возможный ингибирующий эффект Гк.

Цель данного исследования – изучение влияния низких концентраций Гк на созревание и последующее оплодотворение яйцеклеток крупного рогатого скота *in vitro*.

Материал и методы

В этом исследовании, как и в предыдущих наших работах (Сметанина и др., 2006; Сметанина и др., 2014), использовали безбелковую среду MEM-alfa (Sigma, США), в которую добавляли 2 мМ глутамин (Sigma), 0.2 мМ пирувата натрия (Sigma) и 1 мкг/мл фолликулостимулирующего гормона (ФСГ, ФСГ-супер, ООО “Агробιοмед”, Россия). Ооциты опытной группы культивировали с добавлением Гк (Sigma) в концентрации 0.06 мМ. Ооциты культивировали в 4-луночных чашках (Nunc, Дания), по 50 ооцит-кумулясных комплексов на лунку с 500 мкл среды при температуре 38.5°C в течение 24 ч в атмосфере 5%-ного CO₂ в воздухе.

Созревшие *in vitro* ооциты отмывали в среде Тирод (Bavister et al., 1983) с 10 мМ буфером Нерес (Т-Н), содержащей 3 г/л свободного от жирных кислот БСА (Sigma) и помещали для совместного инкубирования со сперматозоидами в 500 мкл среды оплодотворения (из расчёта 10 ооцитов на 50 мкл среды). Для оплодотворения применяли среду Тирод (Т-О) с 25 мМ бикарбонатом натрия (Bavister et al., 1983), дополненную гепарином (Sigma, 10 мкг/мл) и 6 г/л БСА. Сперму готовили методом “всплывания” (Parrish et al., 1986), используя среду 1 для гамет крупного рогатого скота (СГ-1, Parrish et al., 1985) с добавлением пирувата натрия до концентрации 1 мМ и 6 г/л БСА. Концентрация сперматозоидов в среде оплодотворения составляла 3 млн/мл. В среды Т-Н, Т-О и СГ-1 глюкозу не добавляли. Сперматозоиды и яйцеклетки совместно инкубировали в течение 18 ч при температуре 38.5°C в атмосфере 5%-ного CO₂ в воздухе. Во все используемые среды добавляли гентамицин (Sigma) в концентрации 40 мкг/мл.

Для оценки качества созревания и оплодотворения из яйцеклеток контрольной и опытной групп готовили тотальные цитологические препараты по методу Андерсена (Anderson, 1978) в модификации Маленко (Malenko, 1994).

Результаты и обсуждение

В проведенных экспериментах в не содержащую Гк безбелковую культуральную среду MEM-alfa вводили экзогенный Гк в концентрации 0.06 мМ. Это заметно выше, чем в изученных ранее средах, однако, на два порядка меньше, чем в опубликованных работах по исследованию влияния Гк на ооциты млекопитающих *in vitro* (Miyno et al., 1995; Senbon, Miyno., 2002; Ma et al., 2003).

Введение в среду созревания ооцитов крупного рогатого скота даже небольшой дозы Гк (0.06 мМ), значительно уменьшает процент ооцитов, достигших стадии М2 (табл. 1), в результате чего в дальнейшем снижается и процент пенетрированных, и нормально оплодотворённых ооцитов (табл. 2). В нормально оплодотворённых яйцеклетках на препаратах визуализировались два пронуклеуса (мужской и женский). К пенетрированным яйцеклеткам, помимо нормально оплодотворённых, относили также ооциты с тремя и более пронуклеусами, а также ооциты с деконденсированными головками сперматозоидов.

Таблица 1. Влияние гипоксантина на достижение ооцитами крупного рогатого скота *in vitro* стадии метафазы 2

Число ооцитов	Контроль (ФСГ), 24 ч	Опыт (ФСГ + гипоксантин), 24 ч
Идентифицировано на тотальных препаратах, n	87	120
Достигло стадии метафазы 2, n(%)	60(69) ^{***}	52(43.3) ^{***}

Примечание: (данные по трём опытам): ^{***}P < 0.001 по *t* -критерию при сравнении с контролем.

Таблица 2. Влияние гипоксантина, введенного в среду созревания, на оплодотворение ооцитов крупного рогатого скота *in vitro*

Показатели оплодотворения ооцитов	Количество ооцитов	
	Контроль (ФСГ), 24 ч	Опыт (ФСГ + гипоксантин), 24 ч
Идентифицировано на тотальных препаратах, n	60	88
Пенетрировано, n (%)	38(63.3) [*]	38(43.2) [*]
Нормально оплодотворено, n (%)	26(43.3)	21(23.9)

Примечание: (данные по двум опытам): ^{***}P < 0.05 по *t* -критерию при сравнении с контролем.

Ранее было показано, что при высокой концентрации Гк (1-6 мМ) удерживает значительное количество ооцитов свиней и мышей в состоянии ареста мейоза (Miyno et al., 1995; Downs, 1997). Считается, что Гк или его метаболиты блокируют спонтанное созревание ооцитов, препятствуя падению внутриклеточного уровня циклического АМР. Гк в концентрациях от 1 до 6 мМ заметно и дозозависимо ингибировал спонтанное возобновление мейоза в денудированных ооцитах *in vitro*, при этом в ооцитах, культивированных в Гк содержащей среде, наблюдали предшествующую процессу созревания конденсацию хромосом. Ингибирование было обратимым, причём ооциты, освобождённые от влияния Гк, достигали стадии М2 несколько быстрее, чем свежеизолированные из фолликулов ооциты (Miyno et al., 1995).

Гипоксантин, вероятно, может оказывать влияние и на последующее развитие созревших *in vitro* ооцитов крупного рогатого скота. Так, после созревания в средах Waymouth' MB 752/1 и Ham'F-12 с наибольшим содержанием Гк (0.025 и 0.0048 г/л), процент дробления и последующего развития был значительно ниже, чем для остальных изученных сред – SFRE, MEM-alfa, TCM-199,

MEM-alfa/+, RPMI:MEM-alfa (Rose, Bavister, 1992). В нашей предыдущей работе (Сметанина и др., 2000) при сравнении различных бессывороточных культуральных сред были получены данные, позволяющие предположить, что даже низкое содержание Гк в их составе оказывает ингибирующее действие на созревание *in vitro* ооцитов крупного рогатого скота.

Все изученные среды были сложными, многокомпонентными и весьма существенно отличались друг от друга по составу. В частности, они различались по содержанию промежуточного продукта катаболизма пуриновых оснований – гипоксантина в средах ДМЕМ, ТСМ-199, Ham's F-10, Ham's F-12 соответственно). Ранее было показано, что добавление в среду MEM 2 мМ Гк поддерживает остановку мейоза ооцитов у крыс (Daniel et al., 1989). Гипоксантин оказывает блокирующее действие на мейотическое созревание ооцитов у мышей (Downs et al., 1989; Downs et al., 1997).

Поскольку в проведенных опытах наилучшие результаты были получены при использовании сред без гипоксантина или с наименьшей его концентрацией, можно предположить, что гипоксантин способен оказывать ингибирующее действие на созревание *in vitro* ооцитов КРС в безбелковой культуральной системе. В пользу этого говорит и высокое содержание гипоксантина (0.025 г/л) в малоприспособленной для созревания *in vitro* ооцитов КРС среде Waymouth' MB 752/1. Вместе с тем, вопрос о возможном блокирующем влиянии гипоксантина на мейотическое созревание ооцитов КРС требует дальнейшего детального изучения.

Заключение

Результаты данной работы чётко демонстрируют ингибирующий эффект низких концентраций Гк на созревание ооцитов *in vitro*. Введение в безбелковую среду созревания даже небольшой дозы Гк (0.06 мМ, что на два порядка меньше, чем в ранее опубликованных работах), существенно уменьшает процентную долю ооцитов крупного рогатого скота, достигших стадии М2 мейоза, в результате чего в дальнейшем снижается процентная доля и пенетрированных, и нормально оплодотворённых ооцитов. Полученные данные целесообразно учитывать в дальнейших исследованиях, а также в практических работах по созреванию *in vitro* ооцитов млекопитающих.

Список литературы

1. Сметанина И.Г., Татарина Л.В., Кривохарченко А.С. Влияние состава культуральных сред на созревание ооцитов и развитие эмбрионов крупного рогатого скота *in vitro*. // Онтогенез. 2000. Т. 31. № 2. С. 139-143.
2. Сметанина И.Г., Татарина Л.В., Кривохарченко А.С. Оплодотворение ооцитов крупного рогатого скота *in vitro* в безбелковой культуральной системе. // Онтогенез. 2006. Т. 37. № 6. С. 438-443.
3. Сметанина И.Г., Татарина Л.В., Кривохарченко А.С. Влияние гормонов на созревание ооцитов крупного рогатого скота *in vitro* // Бюл. эксперим. биологии и медицины. 2014. Т. 157. № 5. С. 655-658.
4. Anderson G.B. Advances in large mammalian embryo culture. // In: Methods in Mammalian Reproduction (Ed. Daniel J.C.). NY: Acad. Press, 1978. P. 273-284.
5. Bavister B.D., Leibfried M.L., Lieberman G. Development of preimplantation embryos of the golden hamster in a defined culture medium. // Biol. Reprod. 1983. Vol. 28. P. 235-247.
6. Beker van Woudenberg A.B., Gröllers-Mulderij M., Snel C., Jeurissen N., Slerum R., Wolterbeek A. The bovine oocyte *in vitro* maturation model: a potential tool for reproductive toxicology screening. // Reprod. Toxicol. 2012. P. 251-260.
7. Daniel A.J., Armstrong T.D., Gore-Langton R.E. Growth and development of rat oocytes *in vitro*. // Gamete Research. 1989. Vol. 24. P. 109-121.
8. Downs S.M., Daniel A.J., Bornslaeger E.A. et al. Maintenance of meiotic arrest in mouse oocyte by purines: modulation of cAMF levels and cAMF phosphodiesterase activity. // Gamete Research. 1989. Vol. 54. P. 323-334.
9. Downs S.M. Hypoxanthine regulation of oocyte maturation in the mouse: insights using hypoxanthine phosphoribosyl transferase-deficient animals. // Biol. Reprod. 1997. Vol. 57. P. 54-62.

10. Lazzari G., Tessaro I., Crotti G., Galli C., Hoffmann S., Bremer S., Pellizzer C. Development of an *in vitro* test battery for assessing chemical effects of bovine germ cells under the ReProtect umbrella. // *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 2008. Vol. 23. P. 360-370.
11. Luciano A.M., Franciosi F., Lodde V., Corbani D., Lazzari G., Crotti G., Galli C., Pellizzer C., Bremer S., Welmer M., Modena S.C. Transferability and interlaboratory variability assessment of the *in vitro* bovine oocyte maturation (IVM) test within ReProtect. // *Reprod. Toxicol.* 2010. Vol. 30. P. 81-88.
12. Ma S., Lan G., Miao Y. Hypoxanthine inhibition of *in vitro* meiotic resumption in goat oocytes. // *Mol. Reprod. Dev.* 2003. Vol. 66. P. 306-13.
13. Malenko G.P. An improved method for preparing whole specimens from bovine preimplantation embryos: A technique note. // *Theriogenology.* 1994. Vol. 41. P. 1207-1210.
14. Miyano T., Ebihara M., Goto Y., Hirao Y., Nagai T., Kato S. Inhibitory action of hypoxanthine on meiotic resumption of denuded pig follicular oocytes *in vitro*. // *J. Exp. Zool.* 1995. Vol. 273. P. 70-75.
15. Parrish J.J., Susko-Parrish J.L., First N.L. Effect of heparin and chondroitin sulfate on the acrosome reaction and fertility of bovine sperm *in vitro*. // *Theriogenology.* 1985. Vol. 24. P. 237-249.
16. Parrish J.J., Susko-Parrish J.L., Leibfried-Rutledge M.L., Critser E.S., Eyestone W.H., First N.L. Bovine *in vitro* fertilization with frozen-thawed semen. // *Theriogenology.* 1986. Vol. 25. P. 591-600.
17. Rose T., Bavister B.D. Effect of oocyte maturation medium on *in vitro* development of IVF bovine embryos. // *Mol. Reprod. Dev.* 1992. Vol. 31. P. 72-77.
18. Santos R.R., Schoevers E.J., Roelen B.A.J. Usefulness of bovine and porcine IVM/IVF models for reproductive toxicology. // *Reproductive Biology and Endocrinology.* 2014. Vol. 12. P. 117-128.
19. Senbon S., Miyano T. Bovine oocytes in early antral follicles grow in serum-free media: effect of hypoxanthine on follicular morphology and oocyte growth. // *Zygote.* 2002. Vol. 10. P. 301-309.

References (for publication in Russian)

1. Smetanina I.G., Tatarinova L.V., Krivokharchenko A.S. [Effect of the composition of culture media on the maturation of oocytes and the development of embryos in cattle *in vitro*]. *Ontogenez - Ontogenesis.* 2000. 31(2): 139-143.
2. Smetanina I.G., Tatarinova L.V., Krivokharchenko A.S. [Fertilization of bovine oocytes *in vitro* in a protein-free culture system]. *Ontogenez - Ontogenesis.* 2006. 37(6): 438-443.
3. Smetanina I.G., Tatarinova L.V., Krivokharchenko A.S. [Effects of hormones on the maturation of bovine oocytes *in vitro*]. 2014. 157(5): 655-658.

UDC 636.2:591.465.12:612.621.31:57.085.2

**Effects of hypoxanthine in low concentrations on the maturation
and fertilization of bovine oocytes in vitro**

Smetanina I.G.

*Institute of Animal Physiology, Biochemistry and Nutrition - Branch of
Federal Science Center for Animal Husbandry - Ernst VIZh, Borovsk,
Kaluga oblast, Russian Federation*

ABSTRACT. The study of the action of specific substances involved in the regulation of meiosis is of great practical and theoretical interest. One of these substances is hypoxanthine (Hx), one of the components of the follicular fluid. In previous preliminary studies of the maturation of bovine oocytes *in vitro*, it had been shown that with a decrease in the concentration of Hx in the medium, the number of oocytes that resume meiosis and reach the metaphase 2 (M2) stage can increase. These results indicated a possible inhibitory effect of Hx. The aim of this work was to study the effect of a reduced concentration of Hx in the culture medium on the ability of bovine oocytes to reach the metaphase 2 stage and *in vitro* fertilization. It has been shown that the introduction of exogenous Hx, even at a low concentration (0.06 mM) into a Hx-free, protein-free MEM-alfa maturation medium supplemented with 1 µg/ml of follicle-stimulating hormone, significantly reduces the percentage of oocytes reached the metaphase 2 stage (69% in control and 43% in the experiment, $P < 0.001$), and the percentage of penetrated and normally fertilized oocytes (63 and 43% in control, 43 and 24% in experiment, $P < 0.05$). The data obtained may be of practical importance in the development of commercial media for *in vitro* maturation of mammalian oocytes.

Keywords: bovine oocytes, in vitro maturation, metaphase 2, fertilization, follicle-stimulating hormone, hypoxanthine

Problemy biologii productivnykh zhivotnykh - Problems of Productive Animal Biology. 2022. 1: 29-34

Поступило в редакцию: 01.03.2022

Получено после доработки: 14.03.2022

Сведения об авторах:

Сметанина Ирина Геннадьевна, к.б.н., с.н.с. 8(961)006-90-49. sme.irina2011@yandex.ru