

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ цАМФ В МАЛОЙ КОНЦЕНТРАЦИИ В ПЕРВЫЕ ЧАСЫ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ МОЖЕТ СПОСОБСТВОВАТЬ СИНХРОНИЗАЦИИ ЯДЕРНЫХ И ЦИТОПЛАЗМАТИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ В ООЦИТАХ КРС

Сметанина И.Г.

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

Для получения значительного количества полноценных зрелых яйцеклеток и зигот крупного рогатого скота вне организма необходим поиск оптимальных условий и состава культуральных сред. Поскольку большая часть ооцитов, выделенных из яичников коров, подвергается преждевременному мейотическому созреванию без подготовки ооплазмы, это создаёт одно из главных препятствий для их полноценного оплодотворения и развития *in vitro*. Цель данной работы – изучить влияние цАМФ в малой концентрации на процесс возобновления мейоза и последующее оплодотворение яйцеклеток КРС *in vitro*, т.е. выяснить возможность синхронизации ядерного и цитоплазматического созревания ооцитов КРС. Оценивали влияние экзогенного цАМФ, введённого в аналогичную среду созревания ооцитов КРС в течение первых 6 ч, на их созревание и последующее оплодотворение. Показано, что присутствие цАМФ в среде созревания в течение первых 6 ч в концентрации 100 мкМ не оказывало существенного влияния на возобновление мейоза в ооцитах КРС (69% в контрольной группе, 71.6% в опытной, $P > 0.1$). Не наблюдалось существенной разницы между контролем и опытом по процентной доле общей пенетрации (63.3 и 67.4%, $P > 0.1$), и нормального оплодотворения (2 пронуклеуса) (43.3 и 52.8%, $P > 0.05$). Полученные данные имеют значение для дальнейшей работы по синхронизации ядерного и цитоплазматического созревания ооцитов КРС в условиях *in vitro*.

Ключевые слова: ооциты, созревание in vitro, оплодотворение in vitro, крупный рогатый скот, цАМФ.

Проблемы биологии продуктивных животных, 2022, 2: 20-26.

Введение

В последние годы быстрыми темпами развиваются биотехнологические программы по сексированию семени быков, оплодотворению яйцеклеток *in vitro*, клонированию и криоконсервации генетических ресурсов. Для успешного осуществления этих программ необходимо иметь в наличии значительное количество полноценных зрелых яйцеклеток и зигот на ранних стадиях развития.

Крупный рогатый скот относится к малопродуктивным видам животных, поэтому получить от коров достаточное количество яйцеклеток и зигот *in vivo* не представляется возможным. Решить эту проблему реально с помощью созревания ооцитов и оплодотворения яйцеклеток коров вне организма, для чего необходимо создать оптимальные культуральные условия. Ранее было показано, что среда культивирования может влиять на процент ооцитов крупного рогатого скота (КРС), возобновивших мейоз, и на процент ооцитов, достигших стадии метафазы 2(M2) (Сметанина и др., 2000),

Поскольку большая часть ооцитов, выделенных из яичников коров, подвергается преждевременному мейотическому созреванию без подготовки ооплазмы, это создаёт одно из

главных препятствий для их полноценного оплодотворения и развития *in vitro*. В исследованиях на ооцитах мышей, кроликов и крупного рогатого скота было показано, что спонтанно созревшие ооциты имеют незрелую ооплазму, не способную инициировать формирование мужского пронуклеуса, что проявляется в различиях продуктов белкового синтеза, происходящего в условиях *in vivo* и *in vitro* (Schultz, Wasserman, 1977; Van Blerkom, Mc Gaughey, 1978; Kastrop et al., 1990b, 1991). В связи с этим возникает необходимость в синхронизации процессов созревания ядра и цитоплазмы в условиях *in vitro*. В частности, введение ингибиторов ядерного созревания в инкубационную среду можно использовать для синхронизации ядерного и цитоплазматического созревания; например, при сдвигах концентрации цАМФ в культуральной среде можно предупредить преждевременное деление ядра и создать условия для синхронизации созревания ядра и цитоплазмы. Ранее были предприняты попытки синхронизировать созревание ооцитов свиней с использованием структурного аналога цАМФ – дибутирилциклического АМФ (дбцАМФ,) (Funahashi et al., 1997). Было показано, что при наличии 1 мМ дбцАМФ в среде созревания ооцитов в течение первых 20 ч (время сохранения *in vitro* зародышевого пузырька у свиней) культивирования *in vitro* повышается вероятность развития эмбрионов до стадии бластоцисты.

Существует мнение, что у КРС, как и у других видов млекопитающих, уровень цАМФ внутри ооцита может играть роль финального медиатора в модулировании возобновления мейоза, поскольку ооциты КРС обладают аденилатциклазной активностью (Kuyt et al., 1988) и обратимо реагируют на сдвиги концентрации цАМФ (Sirard, First, 1988; Нона, 1988). Установлено, что зародышевый пузырёк в ооцитах КРС *in vitro* сохраняется в течение 6.6 ч (Sirard et al., 1989). Учитывая, что ингибирующее действие цАМФ и его аналогов на ядерное созревание ооцитов млекопитающих проявляется только до момента начала разрушения зародышевого пузырька (Cho. et al., 1974), можно попытаться использовать культивирование с цАМФ в первые 6 ч созревания ооцитов КРС *in vitro* с целью синхронизации ядерных и цитоплазматических процессов. Представляет большой практический и теоретический интерес исследовать действие различных специфических молекул, которые могут участвовать в процессах регуляции мейоза.

Цель данной работы – изучить влияние цАМФ в малой концентрации в первые 6 ч созревания на процесс возобновления мейоза и последующее оплодотворение яйцеклеток КРС *in vitro*, т.е. выявить возможность синхронизации ядерного и цитоплазматического созревания ооцитов КРС в условиях *in vitro*.

Материал и методы

Яичники КРС получали на мясокомбинате и транспортировали в лабораторию в течение 2-3 ч при температуре 30⁰С в фосфатно-буферной среде Дюльбекко (Юрьевец биопрепарат, РФ).

Ооциты выделяли из антральных фолликулов диаметром 2-6 мм методом рассечения. Для эксперимента отбирали ооциты с многослойным компактным кумулюсом. Для созревания ооцитов использовали среду MEM-alfa (Sigma, США) с добавлением 2 мМ глутамин (Serva, Германия), 1 мкг/мл ФСГ (ФСГ-супер, ООО Агробиомед, ВНИИФБиП, цАМФ (ICN, США) до конечной концентрации 10, 100, 500 мкМ в предварительном эксперименте. В основных экспериментах цАМФ вводили в аналогичную среду созревания ооцитов КРС в течение первых 6 ч в конечной концентрации 100 мкМ. Ооциты культивировали в 4-х луночных чашках фирмы Nunc (Дания), по 50 ооцит-кумулясных комплексов на лунку с 500 мкл среды в течение 24 ч.

Созревшие *in vitro* ооциты отмывали в среде TLP (Bavister, Yanagimachi, 1977; Bavister et al., 1983) с 10 мМ буфера Hepes (Т-Н), дополненную 3 г/л BSA (A 4919, Sigma, США) и помещали для совместного инкубирования со сперматозоидами в 500 мкл среды оплодотворения (из расчёта 10 ооцит-кумулясных комплексов на 50 мкл среды). Ооцит-кумулясные комплексы культивировали в 4-х луночных чашках фирмы Nunc (Дания). В работе использовали сперму быка Финал британо-фризской породы. Для оплодотворения применяли среду TLP с 25 мМ бикарбоната натрия (Bavister et al., 1989), дополненную 10 мкг/мл гепарина (Fluka, Швейцария) и 6 г/л БСА. В среде TLP в качестве энергетического источника вместо глюкозы использовали 0.2 мМ пируват натрия (Serva, Германия). Сперму готовили по методу swim-up (Parrish et al., 1986), используя среду

BGM1 (Parrish et al., 1985) с добавлением 1 мМ пирувата натрия и 6 г/л БСА. Гепарин добавляли в капли оплодотворения непосредственно перед внесением спермы. Концентрация сперматозоидов в среде оплодотворения составляла 3 млн/мл. Сперматозоиды и яйцеклетки совместно инкубировали в течение 20 ч.

Во все используемые среды добавляли гентамицин в концентрации 40 мкг/мл. Все этапы культивирования проводили при температуре 38.5^oC, газовая фаза – 5% CO₂ в воздухе. Для оценки качества созревания и оплодотворения, из яйцеклеток контрольной и опытной групп готовили тотальные цитологические препараты (Anderson, 1978).

Результаты и обсуждение

Изучали влияние цАМФ, введенного в среду созревания в течение первых 6ч, на возобновление мейоза ооцитами КРС и на их последующее оплодотворение *in vitro*, т.е. на цитоплазматическое созревание (табл. 2,3).

Для определения рабочей концентрации цАМФ был проведен предварительный эксперимент, в котором исследовали влияние различных концентраций цАМФ на состояние кумулюса ооцит-кумулюсных комплексов (табл. 1). Анализ результатов этого эксперимента показал, что при культивировании ооцит-кумулюсных комплексов в течение 24 ч в среде, содержащей 1 мкг/мл ФСГ (1-я группа), кумулюс ооцитов сильно муцифицируется и расширяется за счёт синтеза и секреции гиалуроновой кислоты в межклеточное пространство. При введении в культуральную среду цАМФ в концентрации 10 мкМ (2-я группа) кумулюс ооцитов был муцифицирован и расширен в той же степени, что и у ооцитов, культивированных с одним ФСГ, т.е. данная концентрация цАМФ не оказала тормозящего влияния на процессы, происходящие в кумулюсе в период созревания ооцитов. В концентрации 500 мкМ (4-я группа) цАМФ оказал сильное тормозящее влияние на кумулюс, он не муцифицировался и не расширялся, по размерам был похож на кумулюс до культивирования, однако цвет его стал более тёмным.

Таблица 1. Влияние разной концентрации цАМФ в среде созревания *in vitro* ооцитов КРС на состояние их кумулюса.

Концентрация цАМФ в среде*(мкМ)	Состояние кумулюса ооцитов
0	Светлый, муцифицированный
10	Светлый, муцифицированный
100	Светлый, слегка муцифицированный
500	Плотный, тёмный

Примечание: * концентрация ФСГ в культуральной среде одна и та же – 1 мкг/мл.

Определённое ингибирующее влияние на ооцит-кумулюсные комплексы наблюдалось при введении в культуральную среду цАМФ в концентрации 100 мкМ (3-я группа), при этом происходило небольшое расширение кумулюса и не отмечалось существенных изменений в цитоплазме ооцитов. Морфологическое исследование ооцитов этой группы выявило задержку мейоза, характеризующуюся сохранением зародышевого пузырька при некоторой степени муцификации кумулюса. Эта концентрация цАМФ была взята как наиболее приемлемая для дальнейшей работы. В первой серии экспериментов изучали влияние экзогенного цАМФ на возобновление мейоза ооцитов КРС *in vitro* (табл. 2).

Полученные результаты свидетельствуют, что при концентрации цАМФ 100 мкМ в среде в течение первых 6 ч не оказывает влияния на возобновление мейоза ооцитами КРС. К возобновившим мейоз относили ооциты, идентифицированные на тотальных цитологических препаратах как достигшие стадий МII и MI. Учитывая данные кумулюсного теста и морфологических исследований, можно сделать вывод, что некоторое ингибирование процесса созревания, имевшее место в обсуждаемых экспериментах, полностью обратимо. В целом,

исследователями признано, что ингибирование ядерного созревания с использованием цАМФ является обратимым процессом (Cho et al., 1974; Mattioli, 1994).

Таблица 2. Влияние цАМФ на возобновление мейоза в ооцитах КРС *in vitro*.

Группы	Количество ооцитов			
	Контроль (с ФСГ, 24 ч)		Опыт (с ФСГ, 24 ч, первые 6 ч с цАМФ, 100 мкМ)	
	n	%	n	%
Ооциты, идентифицированные на тотальных препаратах	87	-	109	-
Возобновило мейоз (МI+МII),	60	69.0	78	71.6

Примечание: приведены значения суммы результатов по трём опытам

Во второй серии экспериментов показано, что присутствие цАМФ в среде созревания в течение первых 6 ч в концентрации 100 мкМ не оказывало существенного влияния на возобновление мейоза в ооцитах КРС (69% в контрольной группе, 71.6% в опытной, $P > 0.1$). Не наблюдалось существенной разницы между контролем и опытом по процентной доле общей пенетрации (63.3 и 67,4%, $P > 0.1$), и нормального оплодотворения (2 пронуклеуса) (43,3 и 52,8%, $P > 0.05$) (табл. 3). Отсутствие различий между контрольной и опытной группами по относительной доле нормальной пенетрации свидетельствует о том, что доля ооцитов, достигших МII, от всех возобновивших мейоз (МI+МII), была одинаковой для обеих групп.

Таблица 3. Влияние цАМФ, добавленного в среду созревания ооцитов КРС, на их последующее оплодотворение *in vitro*.

Группы	Количество ооцитов			
	Контроль (с ФСГ, 24 ч)		Опыт (с ФСГ, 24 ч., первые 6 ч с цАМФ, 100 мкМ)	
	n	%	n	%
Ооциты, идентифицированные на тотальных препаратах	60		89	
Пенетрировано	38	63.3	60	67.4
Нормальное оплодотворение (2 пронуклеуса)	26	43.3	47	52.8

Примечание: приведены значения суммы результатов по двум опытам.

Полученные данные согласуются с результатами исследований, согласно которым присутствие дбцАМФ в среде созревания ооцитов свиней в концентрации 1 мМ в течение первых 20 ч не сказывалось на процентной доле и созревших, и нормально пенетрированных яйцеклеток (Funahashi et al., 1997). В цитированной работе авторы установили, что мейотическая прогрессия ооцитов свиней более синхронизирована, когда они выдержаны с дбцАМФ в течение первых 20 ч в среде созревания *in vitro*. Таким образом, авторам удалось уменьшить асинхронность мейотической прогрессии, которая возникает частично благодаря гетерогенности в морфологии зародышевых пузырьков при сборе ооцитов. Это привело к тому, что процентная доля нормально оплодотворённых ооцитов свиней, которые развиваются до стадии бластоцисты, была почти в два раза выше, когда ооцит-кумуляные комплексы культивировали в первые 20 ч с дбцАМФ, по сравнению с контролем, т.е. оплодотворённые яйцеклетки опытной и контрольной групп не были

идентичны по потенциалу к дальнейшему развитию, и синхронизация мейотической прогрессии ооцитов сказывалась только на продвинутых стадиях развития эмбрионов (ни по проценту дробящихся эмбрионов, ни по процентной доле морул существенной разницы между контролем и опытом не наблюдали).

В последующих исследованиях также установлено, что поддержание оптимальной концентрации цАМФ (путём введения аденилатциклазы в среду) во время сбора и созревания ооцитов КРС позволяет существенно повысить процент развития эмбрионов до стадии бластоцисты (Luciano et al., 1999).

Выявленное в данном исследовании отсутствие межгрупповых различий по процентной доле ооцитов, возобновивших мейоз, и по доле их нормального оплодотворения, в принципе, не означает идентичности этих яйцеклеток, в частности, с точки зрения биохимии. Ранее было показано, что добавление 100 мкМ цАМФ в первые 6-7 ч культивирования вызывает снижение содержания низкомолекулярных фракций (менее 20 кДа) в белковом спектре незрелых ооцитов до уровня зрелых (Журавлева, Рябых, 1990). Возможно, что ооциты, созревающие в различных культуральных системах, различаются по некоторым биохимическим параметрам, что может оказывать влияние на прохождение определённых стадий развития эмбрионов. Подобный эффект наблюдался в экспериментах, проведенных на ооцитах свиней (Funahashi et al., 1997).

Заключение

Результаты проведенного исследования показали, что использование цАМФ в малой концентрации в первые часы культивирования может способствовать синхронизации ядерных и цитоплазматических процессов в ооцитах КРС. Полученные данные имеют несомненное значение для дальнейшей работы по синхронизации ядерного и цитоплазматического созревания ооцитов в условиях *in vitro*. Необходимо дальнейшее изучение влияния разных уровней цАМФ и его структурных аналогов на культивируемые ооциты и исследование воздействия данного фактора на развитие эмбрионов КРС до преимплантационных стадий.

Список литературы

1. Журавлёва Н.И., Рябых В.П. Влияние циклического аденозинмонофосфата на динамику белкового спектра в ооцитах крупного рогатого скота при дозревании *in vitro*. // Материалы I Республиканской конференции “Биотехнологические достижения и перспективы их развития”. Львов, 1990, 16-18 сентября. С. 15.
2. 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.
3. Anderson G.B. Advances in large mammalian embryo culture. // In: Methods in Mammalian Reproduction. (Daniel J.C., ed.). N.Y.: Academic Press, 1978. P. 273-284.
4. Bavister B.D., Yanagimachi R. The effect of sperm extract and energy sources on the motility and acrocome reaction of hamster sperm *in vitro*. // Biol. Reprod. 1977. Vol. 16. P. 228-237.
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. Bavister B.D. A consistently successful procedure for *in vitro* fertilization of golden hamster egg. // Gamete Research. 1989. Vol. 23. P. 139-158.
7. Cho W.U., Stern S., Biggers J.D. Inhibitory effect of dibutyryl cAMP on mouse oocyte maturation *in vitro*. // J. Exp. Zool. 1974. Vol. 187. P. 783-786.
8. Funahashi H., Cantley T.C., Day B.N. Synchronization of meiosis in porcine oocytes by exposure to dibutyryl cyclic adenosine monophosphate improves developmental competence following *in vitro* fertilization. // Biol. Reprod. 1997. Vol. 57. P.49-53.
9. Homa S.T. Effects of cyclic AMF on the spontaneous meiotic maturation of cumulus-free bovine oocytes cultured in chemically defined medium. // J. Exp. Zool. 1988. Vol. 248. P. 222-231.
10. Kastrop P.M.M., Bevers M.M., Destree O.H.J., Kruip Th.A.M. Changes in protein synthesis and phosphorylation patterns bovine oocyte maturation *in vitro*. // J. Reprod. Fert. 1990. Vol. 90. P. 305-310.

11. Kastrop P.M.M., Bevers M.M., Destree O.H.J., Kruip Th.A.M. Protein synthesis and phosphorylation patterns of bovine oocyte maturing *in vivo*. // Mol. Reprod. Dev. 1990. Vol. 90. P. 305-310.
12. Kuyt J.R.M., Kruip T.A.M., De Jong-Brink M. Cytochemical localization of adenylate cyclase in bovine cumulus-oocytes complexes. // Exp. Cell. Res. 1988. Vol. 174. P. 139-145.
13. Luciano A.M., Pocar P., Milanesi E., Modina S., Rieger D., Lauria A., Gandolfi F. Effect of different levels of intracellular cAMF on the *in vitro* maturation of cattle oocytes and their subsequent development following *in vitro* fertilization. // Mol. Reprod. Dev. 1999. Vol. 54. P. 86-91.
14. Mattioli R., Galeati G., Barboni B., Seren E. Concentration of cyclic AMF during the maturation of pig oocytes *in vivo* and *in vitro*. // J. Reprod. Fert. 1994. Vol. 100. P. 403-409.
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. et al. Bovine *in vitro* fertilization with frozen-thawed semen. // Theriogenology. 1986. Vol. 25. P. 591-600.
17. Sirard M.A., First N.L. In vitro inhibition of oocytes nuclear maturation in the bovine. // Biol. Reprod. 1988. Vol. 39. P. 229-234.
18. Sirard M.A., Florman H.M., Leibfried-Rutledge M.L., Barnes F.L., Sims M.L., First N.L. Timing of nuclear progression and protein synthesis necessary for meiotic maturation of bovine oocytes. // Biol. Reprod. 1989. Vol. 40. P. 1257-1263.
19. Schultz R.M., Montgomery R.R., Ward-Bailey P.F., Eppig J.J. Regulation of oocyte maturation in the mouse: possible roles of intercellular communication, cAMF and testosterone. // Dev. Biol. 1983. Vol. 95. P. 294-304.
20. Van Blercom J., McGaughey R.W. Molecular differentiation of the rabbit ovum during oocyte maturation *in vivo* and *in vitro*. // Dev. Biol. 1978. Vol. 63. P. 139-150.

References (for publications in Russian)

1. Zhuravleva N.I., Ryabykh V.P. [Influence of cyclic adenosine monophosphate on the dynamics of the protein spectrum in bovine oocytes during *in vitro* maturation]. In: *Materialy I Respublikanskoi konferentsiya "Biotekhnologicheskie dostizheniya i perspektivy ikh razvitiya.* (Mat. I Repub. Conf.: Biotechnological achievements and prospects for their development). L'vov, 1990, P. 15.
2. Smetanina I.G., Tatarinova L.V., Krivokharchenko A.S. [Influence of the composition of culture media on the maturation of oocytes and the development of bovine embryos *in vitro*]. *Ontogenez - Ontogenesis.* 2000. 31(2): 139-143.

UDC 636.2.082.4:59.089.3:591.3

**Using cAMP in a low concentration during the first hours of cultivation
can promote synchronization of nuclear and cytoplasmatic processes
in cattle oocytes**

Smetanina I.G.

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

ABSTRACT. To obtain a significant number of full-fledged mature eggs and zygotes of cattle outside the body, it is necessary to search for optimal conditions and composition of culture media. Since most of the oocytes isolated from cow ovaries undergo premature meiotic maturation without ooplasm preparation, this creates one of the main obstacles to their full fertilization and development *in vitro*. The purpose of this work is to study the effect of cAMP at low concentrations on the process of meiosis resumption and subsequent fertilization of bovine eggs *in vitro*, i.e. to elucidate the possibility of synchronization of nuclear and cytoplasmic maturation of bovine oocytes. The effect of exogenous cAMP introduced into a similar medium for the maturation of bovine oocytes during the first 6 hours on their maturation and subsequent fertilization was evaluated. It was shown that the presence of cAMP in the maturation medium during the first 6 h at a concentration of 100 μM had no significant effect on the resumption of meiosis in bovine oocytes (69% in control group, 71.6% in experimental group, $P>0.1$). There was no significant difference between control and experiment in terms of the percentage of total penetration (63.3 and 67.4%, $P>0.1$), and normal fertilization (2 pronuclei) (43.3 and 52.8%, $P>0.05$). The data obtained are important for further work on the synchronization of nuclear and cytoplasmic maturation of oocytes under *in vitro* conditions.

Keywords: oocytes, in vitro maturation, in vitro fertilization, cattle, cyclic adenosine monophosphate.

Problemy biologii produktivnykh zhivotnykh - Problems of Productive Animal Biology. 2022, 2: 20-26.

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