

**ИССЛЕДОВАНИЯ ПО РАЗРАБОТКЕ КУЛЬТУРАЛЬНЫХ СИСТЕМ  
ДЛЯ СОЗРЕВАНИЯ ООЦИТОВ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА  
В УСЛОВИЯХ *in vitro*: СОСТОЯНИЕ И ПЕРСПЕКТИВЫ**

<sup>1</sup>Сметанина И.Г., <sup>2</sup>Кривохарченко А.С.

<sup>1</sup>ВНИИ физиологии, биохимии и питания животных, Боровск Калужской обл.,  
Российская Федерация; <sup>2</sup>Институт химической физики им. Н.Н.Семенова РАН,  
Москва, Российская Федерация;

Цель работы – систематизация литературных данных и результатов собственных исследований по ряду аспектов, включая оценку возможности созревания ооцитов коров вне организма в безбелковых средах, использование различных гормональных схем для созревания ооцитов *in vitro*, созревание ооцитов *in vitro* с различными препаратами фолликулостимулирующего гормона, а также возможность созревания ооцитов *in vitro* в среде без гормонов. Воспроизводимые и надежные системы для массового производства эмбрионов крупного рогатого скота в настоящее время имеются во многих лабораториях мира. Культивируемые *in vitro* ооциты (собранные при убое или посредством трансвагинальной ультразвуковой аспирации от живых животных) после 24-28 ч инкубации дают процент ядерного созревания порядка 80-90%. В процессе оплодотворения *in vitro* спермой, капацизированной гепарином, достигается нормальная пенетрация на уровне 50-60% с частотой партеногенетической активации и полиспермии в интервале 10-15% и 5-10% соответственно. Культивируя *in vitro* презумптивные зиготы, из них можно получать до 40% бластоцист. С другой стороны, по качеству такие эмбрионы уступают зародышам, полученным *in vivo* и даже тем зиготам, которые культивировались в яйцеводах овцы, в том числе по морфологическим признакам и по повышенной чувствительности при замораживании. Отмечается также более высокий процент эмбриональных потерь после нехирургических пересадок эмбрионов, полученных *in vitro*, что может быть обусловлено плацентарными дефектами. В целом, эти недостатки создают серьезное препятствие для более эффективного использования полученных *in vitro* эмбрионов в программах по разведению крупного рогатого скота, в которых предполагается использование современных репродуктивных технологий, в том числе получение близнецов, клонирование и трансгенез. Поэтому существует проблема в том, как повысить жизнеспособность получаемых *in vitro* эмбрионов и обеспечить удовлетворительный уровень рождаемости живых потомков. Для успешной реализации биотехнологических программ, а также для целей проведения фундаментальных исследований на эмбрионах, необходимо создание оптимальных культуральных систем, обеспечивающих полноценное созревание ооцитов вне организма. Для решения этой задачи целесообразно проводить поиск максимально «определённых» сред, не содержащих белковых компонентов и других ингредиентов природного происхождения, которые могут быть причиной искажения результатов экспериментов. При использовании яйцеклеток в программах по трансгенезу и клонированию, среда созревания может быть насыщенной различными дополнительными составляющими, но необходимо проводить их тщательное предварительное тестирование.

*Ключевые слова:* ооциты, созревание *in vitro*, гормоны, крупный рогатый скот, предимплантационные эмбрионы

*Проблемы биологии продуктивных животных, 2017, 1: 28-53*

---

<sup>2</sup> Исследования проведены при поддержке РФФИ; проект 16-53-52046

## Введение

БСА – бычий сывороточный альбумин; ГСЖК – гонадотропин сыворотки жеребых кобыл; КРС – крупный рогатый скот; ЛГ – лютеинизирующий гормон; М2 – метафаза второго мейотического деления; ФСГ – фолликулостимулирующий гормон; ЭРФ – эпидермальный ростовой фактор; ЕС (embryo culture) – культивирование эмбрионов; eCG (equine chorionic gonadotropin) – хорионический гонадотропин лошади; FCS (fetal calf serum) – «фетальная сыворотка телёнка» – сыворотка крови плода коровы; HP-HMG (highly purified-HMG) – высокоочищенный менопаузальный гонадотропин; hCG (human chorionic gonadotropin) – человеческий хорионический гонадотропин – хГч; GVBD (germinal vesicle breakdown) – разрушение зародышевого пузырька; ICSI (intracytoplasmic sperm injection) – интрацитоплазматическая инъекция сперматозоида; IVM (*in vitro* maturation) – созревание *in vitro*; IVC (*in vitro* culture) – культивирование *in vitro*; IVF (*in vitro* fertilization) – оплодотворение *in vitro*; IVP (*in vitro* production) – получение *in vitro* жизнеспособных эмбрионов; r-hFSH – рекомбинантный человеческий ФСГ; RT-PCR (real time PCR) – ПЦР в реальном времени; SOF (synthetic oviductal fluid) – синтетическая жидкость яйцевода; u-hFSH HP (urinary human FSH) – высокоочищенный уринарный ФСГ человека.

У млекопитающих и у всех других видов животных под созреванием ооцитов понимают завершение первого мейотического деления и переход на стадию метафазы второго мейотического деления (Дыбан, 1988). Созревание ооцита включает прогрессию от профазы первого мейотического деления до метафазы второго мейотического деления (М2). Процесс мейоза начинается с разрушения зародышевого пузырька (GVBD), затем ооциты проходят первое мейотическое деление до стадии М2. Одновременно с этими событиями ядерного созревания, в цитоплазме происходят биохимические модификации (цитоплазматическое созревание), что в совокупности обеспечивает нормальное оплодотворение и последующее развитие. О завершении ядерного созревания (достижении ооцитами стадии М2) свидетельствует выделение второго направительного тельца. Функциональными показателями созревания ооцитов могут быть несколько критериев: а) нормальное оплодотворение (полноценное формирование пронуклеусов); б) развитие эмбрионов до поздних предимплантационных стадий (морулы/бластоцисты); в) успешная пересадка эмбрионов и получение полноценного потомства.

О рождении первого телёнка в результате оплодотворения *in vitro* сообщалось в работе (Brackett et al., 1982). В этом исследовании использовались яйцеклетки, созревавшие *in vivo*. Преовуляторные и свежеевулированные ооциты были аспирированы или вымыты у доноров, стимулированных гонадотропином. Успешное применение полной системы созревания *in vitro* (IVM) – *in vitro* оплодотворения (IVF) с последующим культивированием (IVC) оплодотворенных яйцеклеток до стадии морулы и бластоцисты, ознаменовало собой определенный прорыв в IVP-технологии.

В течение последних 10-15 лет эта технология значительно шагнула вперед. Воспроизводимые и надежные системы для массового получения эмбрионов крупного рогатого скота (КРС) в настоящее время имеются во многих лабораториях мира. Ооциты, полученные из яичников при убое животных или посредством трансвагинальной (под контролем УЗИ) аспирации яичников, культивируемые *in vitro* в течение 24-28 часов, способны к ядерному созреванию с эффективностью 80-90%. В процессе IVF спермой, капацизированной гепарином, достигается нормальная пенетрация порядка 50-60% с частотой партеногенетической активации и полиспермии порядка 10-15 и 5-10%, соответственно. Культивируя полученные *in vitro* зиготы, можно получать до 40% бластоцист.

Способность созревших *in vitro* ооцитов оплодотворяться и развиваться *in vitro* и *in vivo* (после пересадки реципиентам) показана на многих видах млекопитающих. Однако эмбрионы, полученные *in vitro*, после таких процедур как IVM, обычное IVF или ICSI и эмбриональная культура (ЕС), имеют ряд особенностей.

Развившиеся *in vitro* эмбрионы по качественным показателям уступают зародышам, полученным *in vivo* и даже тем зиготам, которые развивались после пересадки в яйцеводы овцы. Они отличаются по срокам развития, морфологии (они темнее, раньше формируют бластоцель, имеют меньшее количество клеток на эмбрион), метаболизму, экспрессии генов (Lazzari et al., 2002) и обладают повышенной чувствительностью к криоконсервации. Следует

также отметить более высокий процент эмбриональных потерь после нехирургических пересадок эмбрионов, полученных *in vitro*, что может быть следствием плацентарных дефектов. Это серьезное препятствие для более эффективного использования ИVP-эмбрионов в программах по разведению КРС, предусматривающих получение монозиготных близнецов, клонирование, трансгенез и другие исследовательские и практические цели. Будущее в разведении КРС в значительной степени зависит от развития этих новых технологий, поэтому принципиальную значимость приобретает поиск путей для повышения жизнеспособности ИVP-эмбрионов, чтобы получить высокий уровень приживляемости после пересадки как свежих, так и замороженных эмбрионов.

Созревание ооцитов КРС зависит от используемых культуральных систем, что в немалой степени сказывается на их дальнейшем развитии после IVF. Культуральная система созревания *in vitro* включает в себя универсальную комплексную среду, белковую и гормональную составляющие. Эти три основные компоненты сами по себе оказывают влияние на качество созревания ооцитов. Созреванию ооцитов вне организма посвящено множество публикаций, однако представленные данные зачастую неоднозначны и противоречивы.

Цель данной работы – систематизация данных литературы и результатов собственных исследований по ряду аспектов, включая оценку возможности созревания ооцитов коров вне организма в безбелковых средах, использование различных гормональных схем для созревания ооцитов *in vitro*, созревание ооцитов *in vitro* с различными препаратами фолликулостимулирующего гормона (ФСГ), а также возможность созревания ооцитов *in vitro* в среде без гормонов.

#### **Созревание ооцитов КРС *in vitro* в безбелковых средах**

Несмотря на то, что технология получения эмбрионов *in vitro* за последние годы значительно шагнула вперед, ИVP-эмбрионы до сих пор отличаются от получаемых *in vivo*. Из *in vivo* созревших ооцитов в настоящее время можно получать до 70% бластоцист, а из IVM-ооцитов можно получить не более 50%. IVC-процедуры усовершенствовались за последние несколько лет, главным образом, за счет корректировки состава среды, в то время как IVM-протоколы остаются без существенного изменения. Следовательно, целью дальнейших работ по повышению качества и компетенции к развитию созревших ооцитов должно быть создание *in vitro* таких условий, которые максимально приближены к таковым в условиях *in vivo* (Wrenzycki, Stinshoff, 2013). Для того, чтобы максимально использовать потенциал гамет, хранящихся в яичнике, необходимо разработать такие культуральные системы, которые обеспечат наиболее адекватное окружение для выживания ооцитов вне организма. Такие культуральные системы могут быть пригодны не только как экспериментальные модели для изучения механизмов развития ооцитов, но также как системы для практического применения в медицине и сельском хозяйстве (Hirao, 2011).

Способность созревших *in vitro* ооцитов оплодотворяться и развиваться *in vitro* показана на животных многих видов. Тем не менее, исследования показали, что IVM-ооциты более чувствительны к субоптимальным культуральным условиям по сравнению с ооцитами, созревшими *in vivo* (Jinno et al., 1989) и что культуральная среда может влиять на развитие *in vitro* и на последующих этапах *in vivo* (Van de Sandt et al., 1990).

Биологическими компонентами сред, используемых на протяжении многих лет для получения эмбрионов млекопитающих *in vitro*, в том числе и для первоначального этапа созревания, являются сыворотка или сывороточный альбумин. Сыворотка улучшает результаты IVM, но её оптимальный состав очень вариабелен и в полной мере не определен, что создаёт проблемы как в научных исследованиях, так и в клинических применениях. Это также относится и к фолликулярной жидкости, обычно используемой для IVM-ооцитов свиней (Krisher, 2013). Хотя в большинстве культуральных систем в качестве стандартного компонента среды используется сыворотка крови, важно иметь в виду, что сыворотка не является обязательным компонентом для роста ооцитов *in vitro*. Установлено, что ооциты, помещённые в среду без

сыворотки в период после достижения середины фазы роста, могут приобретать компетенцию к продолжению созревания, оплодотворению и развитию до стадии бластоцисты (Errig et al., 1992). Белковые макромолекулы обладают такими существенными свойствами, как предотвращение адгезии к стеклянным и пластиковым поверхностям (сурфактантные свойства), связывание ионов тяжелых металлов, а также поддержание pH среды. Вместе с тем установлено, что сурфактантные функции альбумина могут быть обеспечены синтетическими полимерами, такими как поливинилалкоголь или поливинилпирролидон, в связывание ионов тяжелых металлов и увеличение буферной емкости может осуществляться аминокислотами (Mehta, Kiessling, 1990).

Одним из важнейших аргументов против использования белковых добавок природного происхождения является возможность контаминации культуральной системы патогенными микроорганизмами. Кроме того, наблюдается значительная варибельность между различными партиями белковых добавок, что влияет на воспроизводимость результатов. Таким образом, для исследований на эмбрионах *in vitro* желательно иметь полностью химически «определённую» (chemically defined) синтетическую среду, т.е. не содержащую не идентифицированные или недостаточно исследованные компоненты.

Имеются данные о завершении ядерного созревания ооцитов КРС вне зависимости от таких культуральных добавок, как сыворотка крови, гонадотропины или бикарбонатный буфер (Suss et al., 1988). Культуральная среда, используемая для IVM-ооцитов, обычно имеет универсальную комплексную формулу, первоначально разработанную для культуры соматических клеток и тканей. Наиболее широко используются среды для ооцитов TCM-199 и MEM-alpha. Состав этих сред разработан для удовлетворения общих метаболических потребностей соматических клеток, особенно долгоживущих клеточных линий, а не комплексных и динамических потребностей созревающих ооцитов. Поэтому имеется существенная потребность в разработке среды, используемой специально для IVM-ооцитов (Gilchrist, Thompson, 2007).

Общепринятая система для IVM-ооцитов КРС состоит из многокомпонентной сложной среды (обычно TCM-199), дополненной фетальной сывороткой (FCS) и гормонами. Более «определённая» безбелковая система созревания используется исследователями гораздо реже (Keskintepe et al., 1995; Keskintepe, Brackett, 1996; Сметанина и др., 2000; Кривохарченко и др., 2001; Сметанина и др., 2006; Сметанина и др., 2014). Причем, установлено, что наилучшей безбелковой средой для IVM-ооцитов КРС является не наиболее широко используемая для этих целей среда TCM-199, а MEM-альфа, которая не содержит гипоксантин (Сметанина и др., 2000). Для оценки влияния состава самих сред, а также гормонов на созревание ооцитов целесообразно использовать именно безбелковые среды, так как сыворотка или сывороточный альбумин сами по себе могут влиять на процесс мейоза, цитоплазматическое созревание и дальнейшее развитие эмбрионов. Кроме того значительная варибельность между различными партиями белковых препаратов влияет на воспроизводимость результатов.

Возможность полноценного созревания ооцитов КРС *in vitro* в безбелковой среде доказана в ряде исследований (Lonergan et al., 1994; Keskintepe et al., 1995; Keskintepe, Brackett, 1996), в которых критерием полноценного созревания являлось развитие эмбрионов *in vitro* до стадии вылупившейся бластоцисты или получения живого потомства после пересадки IVP-эмбрионов. Нашей группой показано, что созревание ооцитов КРС в безбелковой среде MEM-alpha с минимальной концентрацией ФСГ (1 мкг/мл), позволяет получать около 50% нормально оплодотворенных яйцеклеток и эмбрионы на стадии бластоцисты, часть из которых вылуплялась. Следует отметить, что вылупление бластоцист является достаточно строгим критерием их жизнеспособности.

Показано, что в безсывороточной среде, только при концентрации свиного ФСГ 1000 нг/мл индуцировалось значительное расширение кумюса в ооцитах КРС, но при концентрации 100 нг/мл эффект был значительно усилен в присутствии 10% сыворотки. По контра-

сту, расширение кумулюса происходило даже в присутствии 1 нг/мл рекомбинантного ФСГ в отсутствие сыворотки (Calder et al., 2003).

В ранних исследованиях утверждалось, что ФСГ-зависимое расширение кумулюса происходило только тогда, когда сыворотка входила в состав культуральной среды (Errig, 1979). Присутствие в субоптимальной культуральной среде глутамина, а также глюкозы или глюкозамина, как предшественников для синтеза гиалуроновой кислоты (ГК), повышает ФСГ-индуцированное расширение кумулюса (Chen et al., 1990). Среда TCM-199, обычно используемая для IVМ-эмбрионов КРС, содержит и глутамин, и глюкозу. Следовательно, в отсутствие сыворотки адекватные концентрации глюкозы и глутамина могут быть необходимы для того, чтобы ФСГ индуцировал расширение кумулюса *in vitro*.

Оптимальное расширение кумулюсных масс является существенным условием для цитоплазматического созревания. У КРС индукция расширения кумулюса перед оплодотворением повышает вероятность пенетрации ооцитов (Ball et al., 1983). Цитоплазматическое созревание сопровождается повышением концентрации глутатиона (Perreault et al., 1988) и способности освобождать внутриклеточный кальций (Fujiwara et al., 1993; Carroll et al., 1996). Процесс расширения кумулюса связан с модификацией щелевых контактов, которые содержат трансмембранные каналы, формируемые посредством белков, происходящих из семейства коннексинов. Кумулюсные клетки коров экспрессируют белки семейства коннексина-43 (Nuttinck et al., 2000). Точно так же, в ходе созревания *in vitro* ооцит-кумулюсные комплексы у КРС теряют коннексин-43 – позитивные щелевые контакты (Sutovsky et al., 1993).

Также установлено, что простагландин Е участвует в индукции расширения кумулюса *in vitro* у коров (Calder et al., 2001). Синтез простагландина контролируется простагландин Н синтетазой-2, известной также как циклооксигеназа-2 (COX-2) (Herschman, 1996). Считается, что среда, используемая для культивирования ооцит-кумулюсных комплексов, нуждается в достаточной концентрации субстратов для воспроизведения темпов синтеза ГК и расширения кумулюса, наблюдаемых в норме *in vivo*. Преобладающим компонентом в расширенном кумулюсе является ГК, и синтез её требуется для объемного расширения кумулюса (Salustri et al., 1989). Глутамин – первоначальный субстрат для синтеза ГК, и добавление глутамина к среде созревания *in vitro* до концентрации 2 мМ стимулирует у КРС расширение кумулюса, а также повышает процент дробления и количество бластоцист (Furnus et al., 1998). Показано также, что сывороточные компоненты позволяют удерживать синтезированную ГК в пределах ооцит-кумулюсного комплекса (Chen et al., 1992).

Показано, что ооциты могут полноценно созреть в среде TCM-199 или в SOF (Tervit et al., 1972) в отсутствие макромолекул, что доказано их последующим развитием до стадии бластоцисты (Lonergan et al., 1994). Однако эффективность развития была существенно ниже по сравнению с контролем, в котором ооциты созревали в среде, содержащей 10% фетальной сыворотки и гормоны (ЛГ, ФСГ и эстрадиол). Причем, было показано, что преимущество контрольной среды созревания над TCM-199 и SOF без макромолекул полностью обусловлено присутствием сыворотки и что в ее отсутствие включение гормонального комплекса существенно угнетало развитие зародышей после стадии дробления.

Напротив, другими авторами (Saeki et al., 1990, 1991) показано, что добавление FCS (с гормонами или без них) к среде TCM-199 не повышает процент ядерного созревания. Добавление одной сыворотки к среде созревания также не сказывалось на оплодотворении и даже значительно понижало процент дробления. В то же время добавление гормонов (в совокупности с сывороткой или без неё) к среде созревания существенно повышало процент оплодотворения, дробления и развития до стадии бластоцисты. Одна FCS в среде созревания не улучшала развитие эмбрионов до стадии бластоцисты по сравнению с контрольной средой (TCM-199 с поливинилпирролидоном).

Во многих исследованиях FCS используется в средах для созревания ооцитов млекопитающих, но необходимо учитывать вариабельность различных коммерческих наборов, т.е. необходимо предварительное тестирование этой составляющей культуральной системы. Гор-

моны (если они не рекомбинантные) также имеют природный источник происхождения, но их биологическая активность известна заранее, поэтому это практически “определенный” компонент культуральной системы.

В последнее время, в связи со вспышками опасных инфекционных заболеваний (губчатая энцефалопатия коров, ящур), внимание к специфическим составляющим культуральных систем должно возрасти. Наша группа в течение 15 лет практикует созревание ооцитов КРС в безбелковой среде. Эти система оказалась пригодной для научно-исследовательских работ как непосредственно по культивированию эмбрионов КРС (Сметанина и др., 2000; Кривохарченко и др., 2001; Сметанина и др., 2006; Сметанина и др., 2014), так и по их клонированию, в котором созревание ооцитов является одним из первоначальных этапов (Сметанина и др., 2013; Кириенко и др., 2007; Рябых и др., 2009).

### **Использование различных гормональных схем для созревания ооцитов *in vitro***

Одним из основных факторов, определяющим полноценность созревания ооцитов *in vitro*, является правильно подобранная гормональная схема. При культивировании ооцитов *in vitro* действие гормональных факторов в большей степени непредсказуемо, по сравнению с системами, работающими *in vivo*. Следует отметить, что в условиях *in vitro* гормоны могут быть взаимозаменяемы по своему физиологическому действию (например, ЛГ и xГч), не говоря уже о том, что эффективные их концентрации в культуральной среде выше на несколько порядков, чем в условиях *in vivo*. Гормоны – это более определённый фактор, чем бычий сывороточный альбумин (БСА) и сыворотка, поэтому данные по их влиянию на культивирование достаточно воспроизводимы. Если гормоны имеют природный источник происхождения (т.е. они не рекомбинантные), их биологическая активность известна заранее, что немаловажно для подбора культуральной среды.

Существенно меньшее количество эмбрионов развивается *in vitro* до стадии бластоцисты, чем *in vivo*, что может быть обусловлено различиями в компетенции ооцитов. Хотя большой процент ооцитов КРС подвергается спонтанному ядерному созреванию, меньше известно о потребностях, необходимых для полноценного цитоплазматического созревания. Как правило, сверхфизиологические концентрации ФСГ и ЛГ добавляются к среде созревания для стимуляции расширения кумулюса, оплодотворения и эмбрионального развития. Ооцит-кумуляные комплексы собирают из 2-8 мм антральных фолликулов, собранных из нестимулированных яичников КРС на мясокомбинате для процедуры ИВМ. Эти фолликулы от предовуляторного состояния отделяет период в несколько дней, поэтому ооциты в них могут получать недостаточное количество гормонов и ростовых факторов, чтобы в итоге аккумулировать материнские мРНК для нормального развития *in vitro*. Исследования показали, что условия созревания (ооциты созревали *in vivo* и *in vitro*) значительно влияют на количество эмбрионов, развивающихся до стадии бластоцисты (Rizos et al., 2002). Это свидетельствует о том, что до сих пор возможны улучшения в среде созревания и самом протоколе созревания с тем, чтобы улучшить компетенцию ооцитов к развитию *in vitro* и последующее эмбриональное развитие *in vivo*. Несмотря на то, что до 80% ооцитов КРС, собранных из антральных фолликулов, продолжают спонтанное ядерное созревание в культуре, гонадотропины почти всегда добавляются к среде созревания для индуцирования цитоплазматического созревания, расширения кумулюса и улучшения эмбрионального развития. При созревании ооцитов речь должна идти не только о преобразовании ядра (разрушение зародышевого пузырька и дальнейшие изменения метафазных хромосом), но и об изменениях цитоплазмы, т.е. о её созревании.

Еще в 1978 году в качестве источника гормонов для созревания ооцитов КРС *in vitro* была успешно использована эстральная сыворотка коров (Newcomb et al., 1978). В результате созревания, оплодотворения, культивирования таких ооцитов *in vivo* и последующей трансплантации бластоцист, были получены первые телята из ооцитов, созревших вне организма. В последующие годы большинство исследовательских групп заменило эстральную сыворотку на более “определенную” культуральную систему – фетальную сыворотку и гормоны.

Хотя ФСГ и ЛГ – это наиболее широко используемые в ИVM-системе гонадотропины (Sutton et al., 2003), следует отметить, что гормональные схемы созревания ооцитов вне организма, применяемые в разных лабораториях мира, существенно различаются. Добавление ФСГ и ЛГ индуцирует расширение кумулюса, ядерное и цитоплазматическое созревание (Caixeta et al., 2012). Есть примеры и раздельного их применения. Так, во многих своих работах мы использовали только ФСГ в концентрации 1 мкг/мл (Сметанина и др., 2000; Кривохарченко и др., 2001; Сметанина и др., 2006). Напротив, другие исследователи использовали только ЛГ, но в нестандартной, очень высокой концентрации – 100 мкг/мл (Keskintere et al., 1995; Keskintere, Brackett, 1996). Обычно ЛГ присутствует в средах в концентрации 5-10 мкг/мл, ФСГ – 0.5-1 мкг/мл. Показано, что при использовании ФСГ для созревания ооцитов КРС *in vitro*, он в равной степени эффективен в концентрациях 0.01, 0.1 и 1 мкг/мл (Loneragan et al., 1994). В то же время, работы по изучению эффектов высоких концентраций ФСГ в культуре *in vitro* нам в литературе не встречались.

В самых ранних работах исследователи использовали один и тот же набор гормонов (ФСГ, ЛГ, эстрадиол), стараясь максимально имитировать условия *in vivo*. В последние десятилетия бластоцисты КРС *in vitro* получены при использовании различных схем созревания (начиная от созревания в безбелковых средах без гормонов вплоть до самого различного сочетания гормонов – ФСГ, ЛГ, эстрадиол, прогестерон, сывороточный гонадотропин, хорионический гонадотропин, хГч, как в белковых, так и в безбелковых средах).

Актуальным остается вопрос поиска оптимальных и недорогих схем созревания ооцитов КРС *in vitro*, чтобы иметь в наличии значительное количество полноценных зрелых яйцеклеток, необходимых для успешного выполнения биотехнологических программ по клонированию КРС. На протяжении ряда лет мы достаточно успешно используем для созревания ооцитов КРС *in vitro* ФСГ отечественного производства (ФСГ-супер, ООО Агробиомед). Этот препарат является высокоочищенным, высокоэффективным и более дешёвым, по сравнению с зарубежными аналогами. ЛГ в нашей стране не производится, а импортный очень дорог, поэтому мы попытались использовать для созревания ооцитов КРС *in vitro* хГч отечественного производства. Исследования показали, что использование одного препарата ФСГ-супер в концентрации 1 мкг/мл (причём, в безбелковой среде) для созревания ооцитов КРС позволяет получать *in vitro* эмбрионы предимплантационных стадий (Сметанина и др., 2003). Учитывая, что ФСГ-супер является высокоочищенным препаратом и содержание ЛГ в нем крайне мало (на 1000-1500 ед. ФСГ приходится 1 ед. ЛГ), мы вносили в среду хГч (0.15 ед/мл), имитируя эффект ЛГ. Это не улучшило показатели развития эмбрионов и даже несколько снизило процент полученных бластоцист и количество клеток в них. Следует отметить, что схожие результаты мы получили и при использовании импортного препарата хГч (“Ovogest”, Intervet, Germany). Таким образом, проведенные исследования показали, что добавление хГч к среде, содержащей ФСГ, не улучшает эффективность созревания ооцитов КРС *in vitro*. Результаты наших экспериментов свидетельствуют и о возможности получения бластоцист из ооцитов, созревающих с добавлением одного ФСГ.

Разнообразие гормональных схем, используемых для созревания ооцитов КРС *in vitro*, возросло в последнее время, причем зачастую этот процесс идет по пути упрощения. Ранее классической считалась схема из 2-3-х гормонов в стандартных концентрациях (ФСГ, ЛГ и ± эстрадиол). Была показана возможность использования хГч вместо ЛГ и ГСЖК вместо ФСГ и ЛГ, что значительно удешевляет процедуру. В настоящее время в исследованиях используются все вышеназванные гормоны в различных сочетаниях и по отдельности, в средах, содержащих белок, и в безбелковых средах.

В настоящее время для индукции суперовуляции у млекопитающих используются как ФСГ, так и ГСЖК. Показано, что для большинства крупных млекопитающих, таких как коровы (Donaldson, Ward, 1986; Lopes da Costa et al., 2001), свиньи (Амиров и др., 2002), овцы (Leoni et al., 2001) и козы (Kiessling et al., 1986), ФСГ является более эффективным препаратом, по сравнению с ГСЖК, – увеличивается выход нормальных эмбрионов, а также появляет-

ся возможность неоднократного использования доноров. Хотя, например, при гормональных обработках крыс эффективность ФСГ и ГСЖК была одинаковой (Pороva et al., 2002). Причем, ГСЖК имеет два неоспоримых преимущества – более низкую стоимость и более простой инъекционный протокол. В то время как *in vivo* ФСГ и ГСЖК сравнивались в большом количестве исследований, при культивировании ооцитов КРС *in vitro* в «определённой» безбелковой системе прямое сравнение этих двух гормонов, насколько нам известно, не проводилось.

Нами было проведено сравнение эффективности двух источников гормонов – ФСГ и ГСЖК при созревании ооцитов КРС *in vitro* (Сметанина и др., 2014). В отдельной серии экспериментов была оценена эффективность созревания ооцитов в зависимости от используемых гормонов – ФСГ, ГСЖК и их комбинация с хГЧ (табл. 1)

Таблица 1. Сравнение четырех схем созревания ооцитов крупного рогатого скота *in vitro*

Схемы созревания	Ооциты	Количество		
		Эмбрионы на стадии дробления, %	Эмбрионы на стадии морулы-бластоцисты, %	
			от общего числа ооцитов	от числа дробившихся эмбрионов
1 мкг/мл ФСГ	206	41.3	20.4	49.6
1 мкг/мл ФСГ+ 0.15 ед/мл хГЧ	171	45.0	18.7	41.6
1 ед/мл ГСЖК	179	42.5	20.7	48.7
1 ед/мл ГСЖК+ 0.15 ед/мл хГЧ	184	37.0	21.2	57.4

Примечание. статистически значимых различий в пределах колонок нет (данные по восьми опытам).

Мы искусственно прервали более длительное воздействие ГСЖК, перенося эмбрионы через 24 ч из среды созревания в среду оплодотворения. В результате не было выявлено различий между группами ооцитов, созревающих с использованием различных гормональных схем, – ни по первоначальному дроблению, ни по развитию эмбрионов до предимплантационных стадий.

Таким образом, в отличие от условий *in vivo*, использование ГСЖК для созревания ооцитов *in vitro* является вполне приемлемым, поскольку при этом можно избежать длительного отрицательного воздействия ГСЖК, перенося ооциты в среду, не содержащую этот гормон.

### Созревание ооцитов крупного рогатого скота *in vitro* с использованием различных препаратов ФСГ

Созревание ооцитов *in vitro* – это новая репродуктивная технология, которая позволяет получать зрелые ооциты, способные поддерживать предимплантационное эмбриональное развитие и дальнейшее развитие до получения живого потомства. Имеются существенные клинические и коммерческие стимулы для повышения эффективности данной технологии, однако на протяжении последнего десятилетия прогресс замедлился. Приходит понимание того, что по сравнению с ооцитами, созревшими *in vivo*, IVМ-ооциты созревают преждевременно и молекулярный каскад, реиницирующий мейоз, у них отличается от такового *in vivo*. Получение эмбрионов продуктивных животных из нестимулированных яичников с использованием IVМ-ооцитов – это рутинная практика и важная базовая технология для искусственного разведения, клонирования и получения трансгенных животных. Лечение бесплодия у женщин с помощью IVМ в настоящий момент значительно менее успешно и не так широко распространено, хотя и очень важно в этой сфере, поскольку эта технология снижает использование стимулирующих гормонов и, как следствие, – неблагоприятные побочные эффекты и стоимость процедур (Gilchrist, Thompson, 2007).

Благодаря большому сходству с человеческими ооцитами в отношении эмбрионального развития, ооциты КРС могут быть более адекватной моделью, чем мыши, для оценки рисков при работе в клиниках с эмбрионами человека (Wrenzycki et al., 2005; Leidenfrost et al., 2011). Предимплантационные эмбрионы КРС представляют собой привлекательную модель для исследований фундаментальных механизмов раннего развития млекопитающих (Loneragan, 2007). В таких важных аспектах, как, например, эпигенетическое репрограммирование и активация эмбрионального генома, эмбрионы КРС более схожи с эмбрионами человека и других млекопитающих – не грызунов, по сравнению с эмбрионами мыши (Bettegowda et al., 2008). Модель КРС является ценной для изучения механизмов фолликулогенеза, созревания ооцитов и репродуктивного старения у женщин (Adams et al., 2012). Важные аспекты подобия с человеком проявляются в схожем характере появления фолликулярных волн, количестве волн в течение менструально/эстрального цикла, селекции доминантного фолликула и овуляции одиночно-го фолликула (Malhi et al., 2005; Bianchi et al., 2010).

В последнее время значительно увеличился диапазон концентрации гормонов, используемых для созревания ооцитов КРС *in vitro*. Можно взять на себя смелость утверждать, что концентрации гормонов, используемых *in vitro*, подбирались в процессе работы эмпирически, и они примерно на три порядка выше, чем средний базальный уровень этих гормонов в крови. Обычно ФСГ используется в концентрации 0.5 или 1 мкг/мл, ЛГ – 5.0-10.0 мкг/мл, однако, некоторые авторы успешно работают с концентрацией ЛГ на уровне 100 мкг/мл (Keskinetepe et al., 1995; Keskinetepe, Brackett, 1996), что на порядок выше условной нормы. Поиск оптимальных концентраций применяемых гормонов актуален также для клиник, специализирующихся на экстракорпоральном оплодотворении человека. Избыточная концентрация гормонов, используемых при стимуляции пациенток, зачастую приводит к синдрому гиперстимуляции и образованию кист, что плохо сказывается на качестве яйцеклеток и на здоровье пациенток. В последнее время наблюдается тенденция к использованию более щадящих гормональных схем, а в идеальном случае – и к работе в режиме естественной овуляции без применения экзогенных гормонов (что особенно распространено в клиниках высокого профессионального статуса).

При изучении влияния ФСГ на ядерное созревание, оплодотворение и раннее эмбриональное развитие IVМ-ооцитов КРС показано, что процент ооцитов на стадии МП после 16 часов инкубации был существенно ниже в присутствии ФСГ, по сравнению с контрольной группой, в то время как количество МП ооцитов через 20 часов не отличалось от контрольной группы (Izadyar et al., 1998). Это указывает на временное ингибирование ядерного созревания под действием ФСГ. В то же время добавление ФСГ в процессе созревания значительно повышало в последующем пропорцию нормально оплодотворенных ооцитов, дробящихся эмбрионов и бластоцист.

Расширение кумулюса ооцитов у коров случается при низких дозах рекомбинантного человеческого ФСГ (r-hFSH) в безсывороточной среде (Calder et al., 2003). ЛГ оказывает благоприятный эффект на созревание ооцитов КРС *in vitro* (Zuelke, Brackett, 1990). В большинстве случаев сверхфизиологические концентрации гормонов добавляются к среде созревания *in vitro*, и пока неясно, насколько эти высокие концентрации действительно необходимы. Свиной ФСГ обычно вносят в среду созревания до концентрации, варьирующей от 0.5-1,0 мкг/мл до 10 мкг/мл, в то время как в организме коров предовуляторный пик ФСГ составляет в среднем 125 нг/мл (Ireland, Roche, 1982). Овечий ЛГ обычно добавляется к среде IVМ в концентрации 5 мкг/мл, но его концентрация *in vivo* у коров во время предовуляторной волны составляет в среднем всего 200 нг/мл (Ireland, Roche, 1982). В последнее десятилетие стали коммерчески доступными рекомбинантные гонадотропины. Это очень чистые источники гормонов, которые позволяют исследовать индивидуальную роль ФСГ и ЛГ без кросс-контаминации гормональными факторами гипофиза, сыворотки и уринарных препаратов.

Расширение кумулюса удалось индуцировать при концентрации r-hFSH всего лишь 1 нг/мл в безсывороточной среде, по контрасту с высокими концентрациями ФСГ из гипофиза

свиньи, которые требовались для расширения кумулюса (Calder et al., 2003). Эти результаты согласуются с недавними сообщениями о том, что низкие концентрации *r*-hFSH (0.01-1,0 Ед/мл, т.е. 1-100 нг/мл) эффективны для созревания *in vitro* у некоторых видов млекопитающих (Izadyar et al., 1998; Alberio, Palma, 1998; Anderiesz et al., 2000). Неясно, почему кумулюс КРС расширяется при более низких дозах *r*-hFSH, по сравнению со свиным ФСГ (*r*FSH). Рекомбинантный человеческий ФСГ также более эффективен для вызывания суперовуляции у женщин, по сравнению с уринарным ФСГ (Schats et al., 2000); предполагается, что рекомбинантный ФСГ содержит больше основных изоформ и меньше деградированных, чем и объясняется его повышенная эффективность.

Возможно, что свиной ФСГ неэффективно связывается с рецепторами ФСГ у КРС, что может объяснить, почему высокие концентрации требуются для инициации расширения кумулюса у КРС. Тем не менее, большинство схем вызывания суперовуляции используют свиной ФСГ. Хотя расширение кумулюса не является необходимым условием для ядерного созревания, расширение кумулюса может быть видимым признаком благополучного цитоплазматического созревания. В условиях *in vivo* расширение кумулюса – это необходимая предпосылка для овуляции и оплодотворения. Однако в условиях IVF, когда несколько тысяч сперматозоидов добавляются к каждой яйцеклетке, имеется возможность оплодотворения ооцитов с нерасширенным кумулюсом, что выливается в неэффективное дальнейшее развитие.

В ооцит-кумулясных комплексах КРС, расширение кумулюса было индуцировано ФСГ коров, свиной и человека в «определённой» культуральной среде, но при этом не выявлено значительной разницы в проценте ооцитов, достигающих стадии МII (Harper, Brackett, 1994; Ali, Sirard, 2002). Информация о механизме действия ФСГ на кумулюсные клетки ограничена. У КРС непосредственная роль ФСГ в расширении кумулюса подтверждена демонстрацией наличия рецепторов в нем для ФСГ; при проведении ПЦР в реальном времени и в экспериментах по гибридизации *in situ* обнаружено, что мРНК для рецепторов ФСГ были представлены у КРС в кумулюсных клетках (Bao et al., 1997).

Механизм действия ФСГ на созревающие ооциты млекопитающих подробно изучен на мышинных ооцитах (Mergiman et al., 1998). Авторы сравнивали влияние ФСГ и эпидермального ростового фактора (ЭРФ) на созревание ооцитов мышей *in vitro*. Несмотря на то, что ФСГ и ЭРФ могли повышать процент оплодотворения, только ФСГ повышал способность к развитию IVF-ооцитов. Это свидетельствует о том, что в отношении оплодотворения, ФСГ и ЭРФ могут действовать через схожие механизмы, в то время как в процессах эмбрионального развития ФСГ оказывает дополнительный эффект на ооциты, а ЭРФ – нет. Точная природа этих эффектов неизвестна. Одно существенное различие – это пути сигнальных преобразований, которые стимулируются этими двумя агентами. Рецептор ФСГ активирует G-белок, связанный с аденилатциклазой, ведущей к повышению концентрации цАМФ; в то время как рецептор ЭРФ активирует тирозинкиназу. Разница в действии этих ферментов отражает разницу в путях сигнальных преобразований. Процент GVBD, то есть ооцитов, вступивших в мейоз, снижается с помощью ФСГ, но не ЭРФ (Downs et al., 1988), преимущественно благодаря временному повышению концентрации цАМФ в ответ на ФСГ. Это временное снижение (задержка) может способствовать дальнейшему улучшению развития IVM-ооцитов посредством синхронизации цитоплазматического и ядерного созревания (Eppig, 1996).

Существуют определённые механизмы положительного влияния ФСГ на эмбрионального развития. Одним из таких возможных механизмов может быть то, что в процессе созревания в присутствии ФСГ снижается процент триплоидии после оплодотворения. Триплоидные эмбрионы способны имплантироваться, но в последующие сроки быстро резорбируются. Большинство эмбриональных потерь наблюдалось после созревания в отсутствие ФСГ (Mergiman et al., 1998). Триплоидия возникает вследствие сохранения (удержания, невыделения) второго полярного тельца после оплодотворения. Отсутствие выделения второго полярного тельца у части IVM-ооцитов может происходить из-за аномальности цитоскелета. Богатый актином слой покрывает вторую мейотическую пластинку в неоплодотворенном ооците, что

важно для выделения полярного тельца (Maro et al., 1984). Следовательно, одна из возможных причин увеличения числа триплоидных эмбрионов может состоять в том, что созревание *in vitro* ингибирует формирование слоя кортикального актина. Под действием ФСГ у хомяков в процессе созревания ооцитов повышается количество полимеризованного актина в кортексе ооцита. Более того, присутствие кортикального актина ведет к повышению процента выделения полярных телец (Plancha, Albertini, 1994). Другим, менее прямым доказательством, является то, что такие манипуляции, как созревание ооцита вне организма и их криоконсервация, разрушают цитоскелет, и они также связаны с появлением аномальностей в выделении полярного тельца после оплодотворения и активации (Webb et al., 1986; Carroll et al., 1989; Bouquet et al., 1992). Тем не менее, основным критерием оценки компетенции к развитию (а, следовательно, и полноценного созревания) является способность ооцитов развиваться *in vivo*; развитие *in vitro* не может использоваться в качестве надежного индикатора цитоплазматического созревания.

Показано также, что ФСГ существенно увеличивает диаметр ооцит-кумулюсных комплексов и потребление глюкозы в течение 20-24 ч созревания, по сравнению с не стимулированными (без ФСГ) комплексами КРС (Sutton-McDowall et al., 2004).

Во многих своих работах мы использовали только ФСГ в концентрации 1 мкг/мл (Сметанина и др., 2000; Кривохарченко и др., 2001; Сметанина и др., 2006). Некоторые авторы использовали только ЛГ, но в нестандартной, очень высокой концентрации – 100 мкг/мл (Keskintepe et al., 1995; Keskintepe, Brackett, 1996). Обычно ЛГ присутствует в средах в концентрации 5-10 мкг/мл, ФСГ – 0.5-1 мкг/мл. При использовании ФСГ для созревания ооцитов КРС *in vitro*, он в равной степени эффективен в концентрациях 0.01, 0.1 и 1 мкг/мл (Lonergan et al., 1994). В то же время, работы по изучению высоких концентраций ФСГ в культуре *in vitro* нам в литературе не встречались.

В наших исследованиях (Сметанина и др., 2014) в отдельной серии экспериментов проводили созревание ооцитов КРС *in vitro* с тремя различными концентрациями ФСГ (1, 10 и 100 мкг/мл). При этом не было выявлено существенных межгрупповых различий по проценту дробящихся эмбрионов, однако в концентрациях 10 и 100 мкг/мл ФСГ значительно снижал развитие эмбрионов до стадии морулы-бластоцисты, по сравнению с группой, в которой ооциты созревали при концентрации ФСГ 1 мкг/мл. Вместе с тем, не было выявлено межгрупповых различий по количеству эмбрионов, развивавшихся до бластоцисты. Таким образом, судя по нашим данным, ооциты КРС достаточно толерантны к сильно повышенным концентрациям ФСГ в культуре (на 1-2 порядка), хотя это несколько ухудшает показатели дальнейшего развития.

При исследовании влияния различных доз ФСГ на ядерное созревание *in vitro* эмбрионов мышей показано, что высокая концентрация ФСГ (2000 нг/мл) не оказывала влияние на размеры метафазной пластинки, но разброс хромосом по ширине пластинки был значительно больше, по сравнению с ооцитами, созревавшими при концентрации ФСГ 2 нг/мл (Roberts et al., 2005). Следовательно, инкубация ооцитов в средах с высокими концентрациями ФСГ может индуцировать хромосомные аномалии в ходе созревания *in vitro*.

Технология рекомбинантных ДНК позволяет получать ФСГ с полным отсутствием ЛГ. Рекомбинантный ФСГ успешно используется для вызывания суперовуляции у коров, что позволяет получать жизнеспособные эмбрионы и подтверждает, что экзогенная ЛГ-активность не является необходимой для фолликулярного созревания и овуляции у стимулированных коров (Wilson et al., 1993). Представляет интерес оценить возможность использования рекомбинантных гормонов для созревания ооцитов КРС *in vitro*. Получены рекомбинантный человеческий ФСГ (r-hFSH; Keene et al., 1989; Van Wezenbeek et al., 1990), рекомбинантный бычий ФСГ (r-bFSH; Wilson et al., 1993) и рекомбинантный свиной ФСГ (r-pFSH; Inaba et al., 1997). Биологическая активность препаратов рекомбинантных ФСГ подобна таковой у продуктов, экстрагированных из гипофизов (Mannaerts et al., 1991; Wilson et al., 1993; Inaba et al., 1997).

Следует отметить, что возможность использования рекомбинантных гормонов широко исследовалась именно на людях, так как эти гормоны почти два десятилетия применяются в клиниках экстракорпорального оплодотворения. Существует множество работ, в которых сравнивалась эффективность использования рекомбинантного и обычного ФСГ, получаемого из мочи женщин в менопаузе. Полученные данные достаточно противоречивы и не выявляют явного преимущества в использовании какого-либо из двух препаратов. Эти данные необходимо учитывать при использовании рекомбинантных гонадотропинов на других видах млекопитающих, в частности, на КРС.

Человеческий менопаузальный гонадотропин (НМГ), получаемый из мочи, и рекомбинантный ФСГ (rFSH) – это два типа гонадотропина, которые обычно используются для стимуляции яичников в существующих репродуктивных технологиях. В отличие от rFSH, НМГ содержит как ФСГ, так и ЛГ-активность (в форме ЛГ и человеческого хорионического гонадотропина – hCG, которые являются коротко- и долгоживущими гормонами соответственно). Так называемый НР-НМГ (highly purified-НМГ, высокоочищенный менопаузальный гонадотропин) содержит больше hCG, чем традиционный НМГ, но меньше ЛГ. Повышенное содержание hCG обеспечивает наибольшую ЛГ-активность, необходимую для развития ооцитов.

Достижения в технике очистки привели к тому, что в последнее время на рынке имеется высокоочищенный уринарный FSH (u-hFSH НР; Metrodin НР, Serono) со специфической активностью >9000 ИЕд ФСГ/мг белка, которая контролируется с применением физико-химического анализа. Поскольку препарат u-hFSH НР имеет высокую степень чистоты, его можно вводить подкожно.

В практике уже длительное время используется рекомбинантный препарат hFSH (r-hFSH, Gonal-F, Serono). Поскольку корректно гликозилировать ФСГ могут только клетки млекопитающих, для достижения полноценной биологической активности r-hFSH продуцируется в генетически модифицированных клетках яичника китайского хомячка (СНО). Применение технологии рДНК для получения r-hFSH, делает производство не только независимым от сбора мочи, но и позволяет получать биохимически чистый продукт со специфической активностью порядка 10000 ИЕд ФСГ/мг белка, обеспечивая, таким образом, локальную толерантность к инъекции и низкую иммуногенность при подкожном введении.

Показано, что НМГ обеспечивает у женщин существенно более высокий процент рождения живого потомства, по сравнению с r-hFSH (Afnan, 2009). При обычном IVF использование НР-НМГ позволяет существенно повысить процент сохранения беременности и рождения живого потомства, по сравнению с r-hFSH, но при использовании интрацитоплазматической инъекции (ICSI) эти показатели были одинаковы для обеих групп (Al-Inany et al., 2009). При использовании r-hFSH существенно выше количество извлекаемых ооцитов и полученных эмбрионов (Frydman et al., 2000), но при этом отмечается тенденция к увеличению числа случаев гиперстимуляции яичников (Frydman et al., 2000; Moro et al., 2015). Между тем не было выявлено разницы между r-hFSH и НР-НМГ по сохранению беременности и рождению живого потомства (Moro et al., 2015; Frydman et al., 2000). Количество больших фолликулов (более 18 мм) и ооцитов было существенно выше при использовании рекомбинантного ФСГ, однако при этом отмечалась тенденция к повышению выхода эмбрионов высокого качества и рождению живого потомства в группе с НР-НМГ (Ye et al., 2012).

Некоторые авторы не нашли подтверждения предположению о клиническом превосходстве Gonal-F (r-hFSH) над Menopur (НР-НМГ) (Jee et al., 2010). Другая группа авторов сделала вывод, что r-hFSH и НР-НМГ схожи по клинической эффективности, поскольку наблюдался одинаковый процент беременностей и рождения живого потомства при использовании r-hFSH и НР-НМГ. По сравнению с НР-НМГ, применение r-hFSH характеризовалось существенно более коротким периодом стимуляции, более низким расходом гонадотропина и увеличением количества ооцитов и эмбрионов (Bjerke et al., 2010).

Установлено, что состав гонадотропных препаратов, используемых для стимуляции яичников, влияет на некоторые показатели качества эмбрионов (Ziebe et al., 2007). Способ-

ность к имплантации эмбрионов высокого качества, полученных при использовании HP-НMG для стимуляции, повышается по сравнению с рекомбинантным гормоном, хотя механизм этого эффекта пока неясен. Количество эмбрионов высокого качества по отношению к числу извлеченных ооцитов было выше при использовании HP-НMG. Кроме того, эмбрионы, полученные с помощью HP-НMG, лучше переносили криоконсервацию. Процент рождения живого потомства, сохранения беременности и успешной имплантации для эмбрионов высокого качества был выше для HP-НMG, чем для r-hFSH.

Установлено, что применение HP-НMG для стимуляции яичников приводит к существенному повышению процента рождения живого потомства, по сравнению со стимуляцией одним r-hFSH без ЛГ-активности (Platteau et al., 2008). Показано существенное повышение процента рождения живого потомства при использовании HP-НMG, по сравнению с r-hFSH – как для традиционного IVF, так и для ICSI (Сoomarasamy et al., 2008).

Эффективность использования рекомбинантных гормонов у КРС исследована значительно меньше, чем на людях, причем это, в основном, эксперименты *in vivo*. Как отмечается, в использовании гормонов, полученных из гипофизов, имеется ряд проблем (по сравнению с рекомбинантными), включая контаминацию другими гормонами, несоответствия внутри- и между партиями и возможность распространения переносчиков заболеваний. Масштабы применения технологии вызывания суперовуляции более чем удвоились за последние 10 лет, но эффективность извлечения годных для пересадки эмбрионов остаётся по-прежнему низкой (примерно 6 эмбрионов на вымывание).

В работе (Takagi et al., 2001) было обнаружено, что рекомбинантный человеческий ФСГ (r-hFSH) ухудшает фолликулярное созревание у телок, по сравнению с хорионическим гонадотропином лошади (eCG), что может быть связано с отсутствием в этом препарате ЛГ-активности и жесткой супрессии пульсации ЛГ после его использования. Обработанные группы значительно отличались друг от друга по продукции стероидов – обработанные r-hFSH телки продуцировали значительно меньшее количество эстрадиола, по сравнению с eCG-стимулированными телками в течение первых дней стимуляции и гораздо меньшее количество прогестерона в период после волны ЛГ. У телок, обработанных r-hFSH, в течение 27-35 ч после инъекции простагландина регистрировалась меньшая амплитуда волны ЛГ. У всех обработанных r-hFSH телок наблюдалась предовуляторная волна ЛГ, но значительно позже, чем в eCG группе. Множественная овуляция наступала только у половины обработанных r-hFSH телок с ЛГ-волной и у всех животных с ЛГ-волной в группе с eCG. Через 24 ч после ЛГ-волны, процент ооцитов на стадии M2 с кортикальными гранулами, расположенными рядом с ооцитом, был значительно ниже в r-hFSH группе (7.3%), чем в eCG группе (55.9%) .

В работе (Carvalho et al., 2014) для вызывания суперовуляции у телок голштинской породы применяли одиночную инъекцию двух вариантов долгоживущего рекомбинантного бычьего ФСГ (типы А и В) и ФСГ, полученного из гипофизов свиньи (Folltropin). Проводили следующие четыре обработки: 1) инъекция 300 mg Folltropin 8 раз в понижающейся дозе в течение 3,5 дней; 2) одиночная инъекция 50 мкг А-г-bFSH; 3) одиночная инъекция 100 мкг А-г-bFSH; 4) одиночная инъекция 50 мкг В-г-bFSH. При обработках 1, 4, 3 и 2, соответственно, количество овуляторных фолликулов составило 25.7; 18.9; 16.6 и 5.9, количество желтых тел – 19.1; 16.1; 15.9 и 2.6, число эмбрионов хорошего качества – 7.6; 6.5; 4.3 и 0.8. Таким образом, одиночная инъекция г-bFSH (обработки 3 или 4) позволяет получать такую же реакцию суперовуляции, как и инъекция Folltropin. Для уточнения доз г-bFSH необходимо проведение дополнительных исследований.

Ранее мы оценили возможность использования человеческого рекомбинантного ФСГ для созревания ооцитов КРС *in vitro* в безбелковой среде MEM-alfa (Сметанина и др., 2015). Критерием успешного созревания считали способность ооцитов после оплодотворения развиваться до стадии морулы-бластоцисты и до стадии бластоцисты. При использовании двух разных препаратов ФСГ были получены примерно одинаковые результаты (табл. 2). Наблюдалась тенденция к улучшению развития эмбрионов до предимплантационных стадий при ис-

пользовании рекомбинантного ФСГ, что обеспечивало существенную разницу по процентной доле морул-бластоцист от дробившихся эмбрионов. Однако следует отметить, что бластоцисты из группы ФСГ-супер лучше вылуплялись (до 70% от общего числа бластоцист), в то время как для группы Гонал-Ф этот показатель составил порядка 45%..

Таблица 2. Созревание и развитие ооцитов крупного рогатого скота *in vitro* при использовании различных препаратов ФСГ

Препараты ФСГ	Ооциты n	Эмбрионы на стадии дробления n (%)	Количество			
			Эмбрионы на стадии морулы- бластоцисты, n (%)		Эмбрионы на стадии бла- стоцисты n (%)	
			от общего числа ооци- тов	от числа дро- бившихся	от общего числа ооци- тов	от числа дробив- шихся
ФСГ-супер	98	48 (49)	20(20.4)	20(41.7 <sup>a</sup> )	10(10.2)	10(20.8)
Гонал-Ф	77	36 (46.8)	23(29.9)	23(63.9 <sup>b</sup> )	11(14.3)	11(30.6)

Примечания: данные по двум повторным экспериментам;  $P < 0.05$  при сравнении значений с индексами <sup>a,b</sup>

Следует отметить, что Гонал-Ф – это чистый ФСГ, не содержащий даже следов ЛГ-активности, в то время как в препарате ФСГ-супер, полученном из свиных гипофизов, всё же содержится некоторое количество ЛГ (ФСГ/ЛГ > 1000). Существует мнение, что ЛГ-активность является не только не критичной, но даже желательной для нормального развития эмбрионов. К тому же Гонал-Ф в 13 раз дороже ФСГ-супер. В целом, выбор гонадотропина для вызывания суперовуляции зависит от наличия на рынке, удобства использования и стоимости. Сравнение рекомбинантного ФСГ с препаратом, полученным из свиных гипофизов, не выявило существенной разницы в отношении развития IVM-ооцитов до предимплантационных стадий. Это согласуется с литературными данными, но необходимы дополнительные исследования.

#### О возможности созревания ооцитов крупного рогатого скота *in vitro* в среде без гормонов

В настоящее время остается открытым вопрос, насколько необходимы гормоны, в принципе, для полноценного созревания ооцитов *in vitro*. Существует небольшое количество исследований, в которых показано, что ооциты, созревшие в среде без гормонов, способны успешно развиваться до предимплантационных стадий (Lonergan et al., 1994; Tajik et al., 1994; Tajik, Niwa, 1998). Причем, авторы продемонстрировали такую возможность при созревании ооцитов КРС в безбелковой среде TCM-199 или в SOF. Учитывая, что ранее нами была показана зависимость эффективности ядерного созревания ооцитов КРС *in vitro* от типа среды (Сметанина и др., 2000), представляло интерес изучить возможность полноценного созревания ооцитов КРС в используемой нами безбелковой среде MEM-alfa без добавления гормонов.

Данные, касающиеся необходимости использования гормонов и их концентрации в средах, противоречивы. Одними авторами показано, что добавление гонадотропинов, ЛГ и/или ФСГ в среду при созревании *in vitro* повышает потенциал развития ооцитов коров (Fukushima, Fukui, 1985; Younis et al., 1989), однако другие авторы сообщали об отсутствии влияния экзогенных гормонов на созревание *in vitro* (Fukui, Ono, 1989). Причины этих расхождений не совсем ясны; возможно, они частично связаны с наличием или отсутствием сыворотки в среде созревания, с источником получения самих гормонов, а также с различиями в составе культуральных систем, используемых после оплодотворения.

Под действием гормонов у ооцитов млекопитающих происходит расширение кумулюсных масс, что является существенным для цитоплазматического созревания. У коров индукция расширения кумулюса перед оплодотворением повышает вероятность пенетрации ооцитов (Ball et al., 1983). С другой стороны, показано, что расширение кумулюса не является необходимым для достижения нормальной ядерной конфигурации в процессе созревания *in vitro* (Sirard et al., 1988). Отмечалось, что ФСГ замедляет ядерное созревание ооцитов коров

(Izadyar et al., 1998). Процент ооцитов на стадии M2 после 16 ч инкубации был значительно ниже в присутствии ФСГ, по сравнению с контрольной группой, в то время как число M2-ооцитов через 20 ч не отличалось от показателя контрольной группы. В то же время, добавление ФСГ в концентрации 0.05 ед./мл в процессе созревания значительно повышало пропорцию нормально оплодотворенных ооцитов, дробящихся эмбрионов и бластоцист. Ингибирование расширения кумулюсных клеток у коров не влияло на ядерное созревание, но было существенным условием для оплодотворения, дробления и развития до бластоцист (Gutnisky et al., 2007). Показано, что ФСГ существенно увеличивает диаметр ооцит-кумулюсных комплексов и потребление глюкозы в течение 20-24 ч созревания, по сравнению с не стимулированными (без ФСГ) комплексами КРС (Sutton-McDowall et al., 2004). Установлено, что добавление ФСГ к созревающим *in vitro* эмбрионам мышей незначительно повышает долю ооцитов, созревших до M2, но повышает процент оплодотворения и дальнейшего эмбрионального развития (Merriman et al., 1998).

Нашей исследовательской группой показано, что возможно полноценное созревание ооцитов КРС без гормонов в безбелковой среде MEM-альфа (Сметанина и др., 2014). В отдельной серии экспериментов установлено, что отсутствие гормонов в среде созревания существенно снижает процент дробящихся эмбрионов, по сравнению с контрольной средой (безбелковая среда MEM-alfa, дополненная 5 мкг/мл ФСГ и 0.3 ед/мл xГч). В то же время, ооциты, созревшие в полностью «определенной» системе (среде MEM-alfa без белка и гормонов) были способны развиваться до поздних предимплантационных стадий (вплоть до начала вылупления бластоцисты), хотя и прослеживалась тенденция к снижению доли развивающихся эмбрионов. При этом качество получаемых в разных опытных группах эмбрионов, оцениваемое по количеству клеток на бластоцисту, было одинаковым.

Основной работой, в которой была изучена возможность полноценного созревания *in vitro* ооцитов коров в полностью «определённой» среде (без белка и гормонов), можно считать исследование (Lonergan et al., 1994). Авторы показали, что и сложная комплексная среда 199 (M199), и SOF способны поддерживать созревание *in vitro* ооцитов коров в высокой пропорции в отсутствие макромолекулярных добавок, что доказано развитием этих ооцитов до стадии бластоцисты (20% и 25%, соответственно). Следует отметить, что добавление смеси трёх гормонов (5 мкг/мл ЛГ, 1 мкг/мл ФСГ, 1 мкг/мл эстрадиола) к безбелковой среде созревания M199 существенно снижало развитие эмбрионов до стадии бластоцисты на 8-й день. При добавлении этих же гормонов к безбелковой среде созревания SOF значительно снижалось развитие эмбрионов до стадии вылупившейся бластоцисты. В наших экспериментах добавление гормонов к безбелковой среде MEM-альфа (5 мкг/мл ФСГ + 0.3 ед/мл xГч) способствовало заметному улучшению первоначального дробления эмбрионов, а также прослеживалась тенденция к улучшению развития эмбрионов до стадии морулы-бластоцисты и до стадии бластоцисты (Сметанина и др., 2014).

Причина расхождений между результатами наших опытов и данными работы (Lonergan et al., 1994) может быть обусловлена различиями в использованных культуральных средах (MEM-альфа и M199). Так, Лонерган и др. наблюдали разницу в результатах даже при использовании различных партий одной и той же среды 199. С другой стороны, возможны различия в используемых гормональных добавках, поскольку гормоны являются, в принципе, достаточно неопределённой составляющей культуральной системы. В целом, можно сделать вывод, что использование MEM-альфа как полностью определённой среды, способной поддерживать созревание *in vitro* ооцитов в отсутствие сыворотки и гормонов, позволяет исследовать специфические метаболические потребности созревающих ооцитов. Однако для того, чтобы выяснить полноценность созревания ооцитов в среде без белка и гормонов, необходимо трансплантировать полученные вне организма эмбрионы реципиентам и изучить их последующее развитие *in vivo* вплоть до рождения.

## Заключение

Воспроизводимые и надёжные системы для массового производства эмбрионов крупного рогатого скота в настоящее время имеются во многих лабораториях мира. При культивировании *in vitro* ооцитов (собранных при убое или посредством трансвагинальной ультразвуковой аспирации от живых животных) в течение 24-28 часов инкубации доля ядерного созревания составляет около 80-90%. В процессе оплодотворения *in vitro* спермой, капцитированной гепарином, достигается нормальная пенетрация около 50-60% с частотой партеногенетической активации и полиспермии в интервале 10-15% и 5-10% соответственно. При культивировании *in vitro* презумптивных зигот можно получать до 40% бластоцист.

С другой стороны, по качеству такие эмбрионы уступают зародышам, полученным *in vivo* и даже тем зиготам, которые культивировались в яйцеводах овцы, в том числе по морфологическим признакам (они темнее, раньше формируют бластоцель, имеют меньшее количество клеток на эмбрион) и по повышенной чувствительности при заморозке. Следует отметить также более высокий процент эмбриональных потерь после нехирургических пересадок эмбрионов, полученных *in vitro*, что может быть обусловлено плацентарными дефектами. В целом, эти недостатки создают серьёзное препятствие для более эффективного использования полученных *in vitro* эмбрионов в программах по разведению КРС, в которых предполагается использование новых репродуктивных технологий, в том числе получение близнецов, клонирование и трансгенез. Будущее разведения КРС в значительной степени зависит от этих новых технологий, поэтому существует проблема в отношении того, как повысить жизнеспособность получаемых *in vitro* эмбрионов и обеспечить удовлетворительный уровень рождаемости живых потомков.

Для успешной реализации биотехнологических программ, а также для целей проведения фундаментальных исследований на эмбрионах, необходимо создание оптимальных культуральных систем, обеспечивающих полноценное созревание ооцитов вне организма. Для решения этой задачи целесообразно проводить поиск максимально «определённых» сред, не содержащих белковых компонентов и других ингредиентов природного происхождения, которые могут быть причиной искажения результатов экспериментов. При использовании яйцеклеток в программах по трансгенезу и клонированию, среда созревания может быть насыщенной различными дополнительными составляющими, но необходимо проводить их тщательное предварительное тестирование.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Амиров А.А., Кривохарченко А.С., Вильянович Л.И., Иванова Л.Б. Индукция суперовуляции у свиной высокоочищенным фолликулостимулирующим гормоном // Сельскохозяйственная биология. – 2002. – № 6. – С. 69-72.
2. Дыбан А.П. Раннее развитие млекопитающих. – Л.: Наука, 1988. – 228 с.
3. Кириенко К.В., Логинов А.Г., Алгулян А.С., Сметанина И.Г., Татарина Л.В., Рябых В.П. Получение клонированных эмбрионов крупного рогатого скота путем трансплантации ядер соматических клеток в энуклеированные ооциты, дозревавшие *in vitro* // Сельскохозяйственная биология. – 2007. – № 4. – С. 53-61.
4. Кривохарченко А.С., Сметанина И.Г., Татарина Л.В. Оплодотворение и развитие ооцитов крупного рогатого скота после сокращенной инкубации со сперматозоидами // Онтогенез. – 2001. – № 4. – С. 283-287.
5. Рябых В.П., Алгулян А.С., Логинов А.Г., Кириенко К.В., Сметанина И.Г., Татарина Л.В. Развитие *in vitro* партеногенетических и клонированных эмбрионов крупного рогатого скота при разных способах искусственной активации цитопластов // Сельскохозяйственная биология. – 2009. – № 4. – С. 37-45.
6. Сметанина И.Г., Татарина Л.В., Кириенко К.В., Алгулян А.С., Логинов А.Г., Рябых В.П. Использование яйцеклеток крупного рогатого скота, дозревавших в безбелковой культуральной системе, в качестве цитопластов в исследованиях по клонированию // Проблемы биологии продуктивных животных. – 2013. – № 2. – С. 36-41.

7. 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.
8. Сметанина И.Г., Татарина Л.В., Кривохарченко А.С. Влияние гормонов на созревание ооцитов крупного рогатого скота *in vitro* // *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. – 2014. – № 5. – С. 655-658.
9. Сметанина И.Г., Татарина Л.В., Кривохарченко А.С. Использование рекомбинантного фолликулостимулирующего гормона человека для созревания ооцитов крупного рогатого скота *in vitro* // *Материалы международной научно-практической конференции “ Пути продления продуктивной жизни молочных коров на основе оптимизации разведения, технологий содержания и кормления животных”*. – Дубровицы: ВИЖ, 2015. – С. 204-208.
10. Сметанина И.Г., Татарина Л.В., Рябых В.П. Использование отечественных гонадотропных препаратов для созревания ооцитов крупного рогатого скота *in vitro* // *Материалы международной конференции “Современные достижения и проблемы биотехнологии сельскохозяйственных животных”*. – Дубровицы: ВИЖ, 2003. – С. 134-136.
11. Сметанина И.Г., Татарина Л.В., Кривохарченко А.С. Оплодотворение ооцитов крупного рогатого скота *in vitro* в безбелковой культуральной системе // *Онтогенез*. – 2006. – № 6. – С. 438-443.
12. Сметанина И.Г., Татарина Л.В., Рябых В.П. Использование отечественных гонадотропных препаратов для созревания ооцитов крупного рогатого скота *in vitro* // *Материалы международной конференции “Современные достижения и проблемы биотехнологии сельскохозяйственных животных”*. – Дубровицы: ВИЖ, 2003. – С. 134-136.
13. Adams G.P., Singh J., Baerwald A.R. Large animal models for the study of ovarian follicular dynamics in women // *Theriogenology*. – 2012. – Vol. 78. – P. 1733-1748.
14. Afnan M. Identifying real differences in live birth rates between HMG and rFSH in IVF // *Reprod. Biomed. Online*. – 2009. – Vol. 18. – Suppl. 2. – P. 25-30.
15. Alberio R., Palma G.A. Development of bovine oocytes matured in a defined medium supplemented with a low concentration of rhFSH // *Theriogenology*. – 1998. – Vol. 49. – P. 195-198.
16. Al-Inany H.G., Abou-Setta A.M., Aboulghar M.A., Mansour R.T., Serour G.J. Highly purified hMG achieves better pregnancy rates in IVF cycles but not ICSI cycles compared with recombinant FSH: a meta-analysis // *Gynecol. Endocrin.* – 2009. – Vol. 25. – P. 372-378.
17. Ali A., Sirard M.A. Effect of the absence or presence of various protein supplements on further development of bovine oocytes during *in vitro* maturation // *Biol. Reprod.* – Vol. 66. – P. 901-905.
18. Anderiesz C., Ferraretti A., Magli C., Fiorentino A., Fortini D., Gianarolli L., Jones G.M., Trounson A.O. Effect of recombinant human gonadotrophins on human, bovine and murine oocyte meiosis, fertilization and embryonic development // *Hum. Reprod.* – 2000. – Vol. 15. – P. 1140-1148.
19. Ball G.D., Leibfried M.L., Lenz R.W., Ax R.L., Bavister B.D., First N.L. Factors affecting successful *in vitro* fertilization of bovine follicular oocytes // *Biol. Reprod.* – 1983. – Vol. 28. – P. 717-725.
20. Bao B., Garverick H.A., Smith G.W., Smith M.F., Salfen B.E., Youngquist R.S. Changes in messenger ribonucleic acid encoding luteinizing hormone receptor, cytochrome P450 side chain cleavage, and aromatase are associated with recruitment and selection of bovine ovarian follicles // *Biol. Reprod.* – 1997. – Vol. 56. – P. 1158-1168.
21. 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.
22. Bettegowda A., Lee K.B., Smith G.W. Cytoplasmic and nuclear determinants of the maternal-to-embryonic transition // *Reprod. Fertil. Dev.* – 2008. – Vol. 20. – P. 45-53.
23. Bianchi P.H.D., Serafini P., da Rocha A.M., Hassun P.A., da Motta E.L.A., Baruselli P.S., Baracat E.C. Follicular waves in the human ovary; a new physiological paradigm for novel ovarian stimulation protocols // *Reprod. Sci.* 2010. – Vol. 17. – P. 1067-1076.
24. Bjercke S., Tanbo T., Abyholm T., Omland A., Opjen H.K., Fedorcsak P. Clinical outcome following stimulation with highly purified hMG or recombinant FSH in patients undergoing their first treatment cycle of IVF or ICSI // *Acta Obstet. Gynecol. Scand.* – 2010. – Vol. 89. – P. 1053-60.
25. Bouquet M., Selva J., Auroux M. The incidence of chromosomal abnormalities in frozen-thawed mouse oocytes after *in vitro* fertilization // *Hum. Reprod.* – 1992. – Vol. 7. – P. 76-80.
26. Caixeta E.S., Machado M.F., Ripamonte P., Price C., Buratini J. Effects of FSH on the expression of receptors for oocyte-secreted factors and members of the EGF-like family during *in vitro* maturation in cattle // *Reprod. Fertil. Dev.* – 2012. – Vol. 25. – P. 890-899.

27. Calder M.D., Caveney A.N., Westhusin M.E., Watson A.J. Cyclooxygenase-2 and prostaglandin E2 (PGE2) receptor messenger RNA<sub>s</sub> are affected by bovine oocyte maturation time and cumulus-oocyte complex quality, and PGE2 induces moderate expansion of the bovine cumulus in vitro // *Biol. Reprod.* – 2001. – Vol. 65. – P. 135-140.
28. Carroll J., Jones K.T., Whittingham D.G. Ca<sup>2+</sup> release and the development of Ca<sup>2+</sup> release mechanisms during oocyte maturation // *Rev. Reprod.* – 1996. – Vol. 1. – P. 137-143.
29. Carroll J., Warnes G.M., Matthews C.D. Increase in digyny explains polyploidy after in vitro fertilization of frozen-thawed mouse oocytes // *J. Reprod. Fert.* – 1989. – Vol. 85. – P. 489-494.
30. Carvalho P.D., Hackbart K.S., Bender R.W., Baez G.M., Dresch A.R., Guenther J.N., Souza A.H., Fricke P.M. Use of a single injection of long-acting recombinant bovine FSH to superovulate Holstein heifers: a preliminary study // *Theriogenology.* – 2014. – Vol. 82. – P. 481-489.
31. Chen L., Mao S.J.T., Larsen W.J. Identification of a factor in fetal bovine serum that stabilizes the cumulus extracellular matrix // *J. Biol. Chem.* – 1992. – Vol. 267. – P. 12380-12386.
32. Chen L., Wert S.E., Hendrix E.M., Russel P.T., Cannon M., Larsen W.J. Hyaluronic acid synthesis and gap junction endocytosis are necessary for normal expansion of the cumulus mass // *Mol. Reprod. Dev.* – 1990. – Vol. 26. – P. 236-247.
33. Coomarasamy A., Afnan M., Cheema D., van der Veen F., Bossoyt P.M., van Wely M. Urinary hMG versus recombinant FSH for controlled ovarian hyperstimulation following an agonist long down-regulation protocol in IVF or ICSI treatment: a systematic review and meta-analysis // *Human Reproduction.* – 2008. – Vol. 23. – P. 310-315.
34. Eppig J.J. Gonadotropin stimulation of the expansion of cumulus oophori isolated from mice: general conditions for expansion in vitro // *J. Exp. Zool.* – 1979. – Vol. 208. – P. 111-120.
35. Eppig J.J. Coordination of nuclear and cytoplasmic oocyte maturation in eutherian mammals // *Reprod. Fertil. Dev.* – 1996. – Vol. 8. – P. 485-489.
36. Eppig J.J., Wigglesworth K., O'Brien M.J. Comparison of embryonic developmental competence of mouse oocytes grown with and without serum // *Mol. Reprod. Dev.* – 1992. – Vol. 32. – P. 33-40.
37. Frydman R., Howles C.M., Fruong F. A double-blind, randomized study to compare recombinant human follicle stimulating hormone (FSH; Gonal-F) with highly purified urinary FSH (Metrodin HP) in women undergoing assisted reproductive techniques including intracytoplasmic sperm injection // *Human Reproduction.* – 2000. – Vol. 15. – P. 520-525.
38. Fujiwara T., Nakade K., Shirakawa H., Miyazaki S. Development of inositol trisphosphate-induced calcium release mechanisms during maturation of hamster oocytes // *Dev. Biol.* – 1993. – Vol. 156. – P. 69-79.
39. Fukui Y., Ono H. Effects of sera, hormones and granulosa cells added to culture medium for in vitro maturation, fertilization, cleavage and development of bovine oocytes // *J. Reprod. Fert.* – 1989. – Vol. 86. – P. 501-506.
40. Fukushima M., Fukui Y. Effects of gonadotropins and steroids on the subsequent fertilizability of extrafollicular bovine oocytes cultured in vitro // *Anim. Reprod. Sci.* – 1985. – Vol. 9. – P. 323-332.
41. Gilchrist R.B., Thompson J.G. Oocyte maturation: Emerging concepts and technologies to improve developmental potential in vitro // *Theriogenology.* – 2007. – Vol. 67. – P. 6-15.
42. Gutnisky C., Dalvit G.C., Pintos L.N., Thompson J.G., Beconi M.T., Cetica P.D. Influence of hyaluronic acid synthesis and cumulus mucification on bovine oocyte in vitro maturation, fertilization and embryo development // *Reprod. Fertil. Dev.* – 2007. – Vol. 19. – P. 488-497.
43. Furnus C.C., De Matos D.G., Moses D.F. Cumulus expansion during in vitro maturation of bovine oocytes: relationship with intracellular glutathione level and its role on subsequent embryo development // *Mol. Reprod. Dev.* – 1998. – Vol. 51. – P. 76-83.
44. Harper K.M., Brackett B.G. Bovine blastocyst development after in vitro maturation in a defined medium with epidermal growth factor and low concentrations of gonadotropins // *Biol. Reprod.* – 1993. – Vol. 48. – P. 409-416.
45. Herschman H.R. Review: prostaglandin synthase-2 // *Biochim. Biophys. Acta.* – 1996. – Vol. 1299. – P. 125-140.
46. Hirao Y. Conditions affecting growth and developmental competence of mammalian oocytes in vitro // *Anim. Sci. J.* – 2011. – Vol. 82. – P. 187-197.
47. Inaba T., Mori J., Ohmura M. Baculovirus-insect cell production of bioactive porcine FSH // *Theriogenology.* – 1997. – Vol. 47. – P. 491-499.

48. Ireland J.J., Roche J.F. Development of antral follicles in cattle after prostaglandin-induced luteolysis: changes in serum hormones, steroids in follicular fluid, and gonadotropin receptors // *Endocrinology*. – 1982. – Vol. 111. – P. 2077-2086.
49. Izadyar F., Zeinstra E., Bevers M.M. Follicle stimulating hormone and growth hormone act differently on nuclear maturation while both enhance developmental competence of in vitro matured bovine oocytes // *Mol. Reprod. Dev.* – 1998. – Vol. 51. – P. 339-345.
50. Jee B.C., Suh C.S., Kim Y.B., Kim S.H., Moon S.Y. Clinical efficacy of highly purified hMG versus recombinant FSH in IVF/ICSI cycles: a meta-analysis // *Gynecol. Obstet. Invest.* – 2010. – Vol. 70. – P. 132-137.
51. Jinno M., Sandow B.A., Iizuka R., Hodgen G.D. Full physiological maturation in vitro of immature mouse oocytes induced by sequential treatment with follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone // *J. In Vitro Fert. Embryo Transf.* – 1990. – Vol. 7. – P. 285-291.
52. Keene J.L., Matzuk M.M., Otani T., Fauser B.C.J.M., Galway A.B., Hsuesh A.J.W., Boime J. Expression of biologically active human follitropin in Chinese hamster ovary cells // *J. Biol. Chem.* – 1989. – Vol. 264. – P. 4769-4775.
53. Keskindepe L., Burnley C.A., Brackett B.G. Production of viable bovine blastocysts in defined in vitro conditions // *Biol. Reprod.* – 1995. – Vol. 52. – P. 1410-1417.
54. Keskindepe L., Brackett B.G. In vitro developmental competence of in vitro matured bovine oocytes fertilized and cultured in completely defined media // *Biol. Reprod.* – 1996. – Vol. 55. – P. 333-339.
55. Krisher R.L. In vivo and in vitro environmental effects on mammalian oocyte quality // *Annu. Rev. Anim. Biosci.* – 2013. – Vol.1. – P. 393-417.
56. Lazzari G., Wrenzycki C., Herrmann D., Duchi R., Kruij T., Niemann H., Galli C. Cellular and molecular deviations in bovine in vitro produced embryos are related to the large offspring syndrome // *Biol. Reprod.* – 2002. – Vol. 67. – P. 767-775.
57. Leidenfrost S., Boelhaue M., Reichenbach M., Gungor T., Reichenbach H.D., Sinowatz F., Wolf E., Habermann F.A. Cell arrest and cell death in mammalian preimplantation development: lessons from the bovine model // *PLoS One*. – 2011. – Vol. 6. – P. 1-13.
58. Leoni G., Bogliolo L., Pintus P., Ledda S., Naitana S. Sheep embryos derived from FSH/eCG treatment have a lower in vitro viability after vitrification than those derived from FSH treatment // *Reprod. Nutr. Dev.* – 2001. – Vol. 41. – P. 239-246.
59. Lonergan P., Carolan C., Mermillod P. Development of bovine embryos in vitro following oocytes maturation under defined conditions // *Reprod. Nutr. Develop.* – 1994. – Vol. 34. – P. 329-339.
60. Lopes da Costa L., Chagas e Silva J., Robalo Silva J. Superovulatory response, embryo quality and fertility after treatment with different gonadotropins in native cattle // *Theriogenology*. – 2001. – Vol. 56. – P. 65-77.
61. Malhi P.S., Adams G.P., Singh J. Bovine model for the study of reproductive aging in women: follicular, luteal, and endocrine characteristics // *Biol. Reprod.* – 2005. – Vol.73. – P. 45-53.
62. Mannaerts B.M.J.L., de Leeuw R., Geelen J., Van Ravestein A., Van Wezenbeek P., Schuurs A., Kloosterboer H. Comparative in vitro and in vivo studies on the biological characteristics of recombinant human follicle-stimulating hormone // *Endocrinology*. – 1991. – Vol. 129. – P. 2623-2630.
63. Maro B., Johnson M.J., Pickering S.J., Flach G. Changes in actin distribution during fertilization of the mouse egg // *J. Embryol. Exp. Morphol.* – 1984. – Vol. 81. – P. 211-237.
64. Merriman J.A., Whittingham D.G., Carroll J. The effect of follicle stimulating hormone and epidermal growth factor on the developmental capacity of in vitro matured mouse oocytes // *Hum. Reprod.* – 1998. – Vol. 13. – P. 690-695.
65. Moro F., Scarinci E., Palla C., Romani F., Familiari A., Tropea A., Leoncini E., Lanzzone A., Apa R. Highly purified hMG versus recombinant FSH plus recombinant LH in intrauterine insemination cycles in women >35years: a RCT // *Hum. Reprod.* – 2015. – Vol. 30. – P. 179-185.
66. Mehta T.S., Kiessling A.A. Development potential of mouse embryos conceived in vitro and cultured in ethylenediaminetetraacetic acid with or without amino acids or serum // *Biol. Reprod.* – 1990. – Vol. 43. – P. 600-606.
67. Newcomb R., Christie W.B., Rowson L.E.A. Birth of calves, after in vivo fertilization of oocytes removed from follicles and matured in vitro // *Vet. Rec.* – 1978. – Vol. 102. – P. 461-462.
68. Nuttinck F., Peynot N., Humblot P., Massip A., Dessy F., Flechon J.E. Comparative immunohistochemical distribution of connexin 37 and connexin 43 throughout folliculogenesis in the bovine ovary // *Mol. Reprod. Dev.* – 2000. – Vol. 57. – P. 60-66.

69. Perreault S.D., Barbee R.R., Slott V.L. Importance of glutathione in the acquisition and maintenance of sperm nuclear decondensing activity in maturing hamster oocytes // *Dev. Biol.* – 1988. – Vol. 125. – P. 181-186.
70. Platteau P., Nyboe Andersen A., Loft A., Smitz J., Danglas P., Devroey P. Highly purified HMG versus recombinant FSH for ovarian stimulation in IVF cycles // *Reprod. Biomed. Online.* – 2008. – Vol. 17. – P. 190-198.
71. Popova E., Krivokharchenko A., Ganten D., Bader M. Comparison between PMSG- and FSH-induced superovulation for the generation of transgenic rats // *Mol. Reprod. Dev.* – 2002. – Vol. 63. – P. 177-182.
72. Rizos D., Ward F., Duffy P., Boland M.P., Lonergan P. Consequences of bovine oocyte maturation, fertilization or early embryo development in vitro versus in vivo: Implication for blastocyst yield and blastocyst quality // *Mol. Reprod. Dev.* – 2002. – Vol. 61. – P. 234-248.
73. Roberts R., Iatropoulou A., Ciantar D., Stark J., Becker D., Franks S., Hardy K. Follicle-stimulating hormone affects metaphase I chromosome alignment and increases aneuploidy in mouse oocyte matured in vitro // *Biol. Reprod.* – 2005. – Vol. 72. – P. 107-118.
74. Saeki K., Leibfried-Rutledge M.L., First N.L. Are fetal calf serum and hormones necessary during in vitro maturation of cattle oocytes for subsequent development? // *Theriogenology.* – 1990. – Vol. 33. – P. 316.
75. Saeki K., Hoshi M., Leibfried-Rutledge M.L., First N.L. In vitro fertilization and development of bovine oocytes matured in serum-free medium // *Biol. Reprod.* – 1991. – Vol. 44. – P. 256-260.
76. Salustri A., Yanagishita M., Hascall V. Synthesis and accumulation of hyaluronic acid and proteoglycans in the mouse cumulus cell oocyte complex during follicle stimulating hormone induced mucification // *J. Biol. Chem.* – 1989. – Vol. 264. – P. 13840-13847.
77. Schats R., Sutter P.D., Bassil S., Kremer J.A., Tournaye H., Donnez J. Ovarian stimulation during assisted reproduction treatment: a comparison of recombinant and highly purified urinary human FSH. On behalf of The Feronia and Apis study group // *Hum. Reprod.* – 2000. – Vol. 15. – P. 1691-1697.
78. Sirard M.A., First N.L. In vitro inhibition of oocyte nuclear maturation in the bovine // *Biol. Reprod.* – 1988. – Vol. 39. – P. 229-234.
79. Suss H., Wuthrich K., Stransinger J.G. Chromosome configurations and time sequence of the first meiotic division in bovine oocytes matured in vitro // *Biol. Reprod.* – 1988. – Vol. 38. – P. 871-880.
80. Sutovsky P., Flechon J.E., Flechon B., Motlik J., Peynot N., Chesne P., Heyman Y. Dynamic changes of gap junctions and cytoskeleton during in vitro culture of cattle oocyte cumulus complexes // *Biol. Reprod.* – 1993. – Vol. 49. – P. 1277-1287.
81. Sutton M.L., Gilchrist R.B., Thompson J.G. Effects of in vivo and in vitro environments on the metabolism of the cumulus-oocyte complex and its influence on oocyte developmental capacity // *Hum. Reprod. Update.* – 2003. – Vol. 9. – P. 35-48.
82. Sutton-McDowall M.L., Gilchrist R.B., Thompson J.G. Cumulus expansion and glucose utilization by bovine cumulus-oocyte complexes during in vitro maturation: the influence of glucosamine and follicle-stimulating hormone // *Reproduction.* – 2004. – Vol. 128. – P. 313-319.
83. Tajik P., Niwa K. Effects of caffeine and/or heparin in a chemically defined medium with or without glucose on in penetration of bovine oocytes and their subsequent development // *Theriogenology.* – 1998. – Vol. 49. – P.771-777.
84. Tajik P., Wang W., Okuda K., Niwa K. In vitro fertilization of bovine oocytes in a chemically defined, protein-free medium varying the bicarbonate concentration // *Biol. Reprod.* – 1994. – Vol. 50. – P. 1231-1237.
85. Takagi M., Kim J.H., Izadyar F., Hyttel P., Bevers M.M., Dieleman S.J., Hendriksen P.J.M., Vos P.L. Impaired final follicular maturation in heifers after superovulation with recombinant human FSH // *Reproduction.* – 2001. – Vol.121. – P. 941-951.
86. Tervit H.R., Whittingham D., Rowson L. Successful culture in vitro of sheep and cattle ova // *J. Reprod. Fertil.* – 1972. – Vol. 30. – P. 493-497.
87. Van De Sandt J.J.M., Schroeder A.C., Eppig J.J. Culture media for mouse oocyte maturation affect subsequent embryonic development // *Mol. Reprod. Dev.* – 1990. – Vol. 25. – P. 164-171.
88. Van Wezenbeek P., Draaijer J., van Meel F., Olijve W. Recombinant follicle-stimulating hormone I. Construction, selection and characterization of a cell line // In: *From clone to clinic, developments in biotechnology.* – Kluwer Academic, Dordrecht, Netherlands, 1990. – Vol.1. – P. 245-251.
89. Webb M., Howlett S.K., Maro B. Parthenogenesis and cytoskeletal organization in ageing mouse eggs // *J. Embryol. Exp. Morphol.* – 1986. – Vol. 95. – P. 131-145.
90. Wilson J.M., Jones A.L., Moore K., Looney C.R., Bondioli K.L. Superovulation of cattle with a recombinant-DNA bovine follicle-stimulating hormone // *Anim. Reprod. Science.* – 1993. – Vol. 33. – P. 71-82.

91. Wrenzycki C., Herrmann D., Lucas-Hahn A., Korsawe K., Lemme E., Niemann H. Messenger RNA expression patterns in bovine embryos derived from in vitro procedures and their implications for development // *Reprod. Fertil. Dev.* – 2005. – Vol. 17. – P. 23-35.
92. Wrenzycki C., Stinshoff H. Maturation environment and impact on subsequent developmental competence of bovine oocytes // *Reprod. Dom. Anim.* – 2013. – Vol. 48. – Suppl. – P. 38-43.
93. Ye H., Huang G., Pei L., Zeng P., Luo X. Outcome of in vitro fertilization following stimulation with highly purified hMG or recombinant FSH in downregulated women of advanced reproductive age: a prospective, randomized and controlled trial // *Gynecol. Endocrinol.* – 2012. – Vol. 28. – P. 540-544.
94. Younis A.J., Brackett B.G., Fayer-Hosken R.A. Influence of serum and hormones on bovine oocyte maturation and fertilization in vitro // *Gamete Res.* – 1989. – Vol. 23. – P. 189-201.
95. Ziebe S., Lundin K., Janssens R., Helmaard L., Arce J.C. Influence of ovarian stimulation with HP-hMG or recombinant FSH on embryo quality parameters in patients undergoing IVF // *Hum. Reprod.* – 2007. – Vol. 22. – P. 2404-2413.
96. Zuelke K.A., Brackett B. Luteinizing hormone-enhanced in vitro maturation of bovine oocytes with and without protein supplementation // *Biol. Reprod.* – 1990. – Vol. 43. – P. 784-787.

#### REFERENCES

1. Adams G.P., Singh J., Baerwald A.R. Large animal models for the study of ovarian follicular dynamics in women. *Theriogenology*. 2012, 78: 1733-1748.
2. Afnan M. Identifying real differences in live birth rates between HMG and rFSH in IVF. *Reprod. Biomed. Online*. 2009, 18(Suppl. 2): 25-30.
3. Alberio R., Palma G.A. Development of bovine oocytes matured in a defined medium supplemented with a low concentration of rhFSH. *Theriogenology*. 1998, 49: 195-198.
4. Al-Inany H.G., Abou-Setta A.M., Aboulghar M.A., Mansour R.T., Serour G.J. Highly purified hMG achieves better pregnancy rates in IVF cycles but not ICSI cycles compared with recombinant FSH: a meta-analysis. *Gynecological Endocrinology*. 2009, 25: 372-378.
5. Ali A., Sirard M.A. Effect of the absence or presence of various protein supplements on further development of bovine oocytes during in vitro maturation. *Biol. Reprod.* 66: 901-905.
6. Amirov A.A., Krivokharchenko A.S., Vil'yanovich L.I., Ivanova L.B. [Induction of superovulation in pigs using highly purified FSH]. *Sel'skokhosyaistvennaya biologiya - Agricultural Biology*. 2002, 6: 69-72.
7. Anderiesz C., Ferraretti A., Magli C., Fiorentino A., Fortini D., Gianarolli L., Jones G.M., Trounson A.O. Effect of recombinant human gonadotrophins on human, bovine and murine oocyte meiosis, fertilization and embryonic development. *Hum. Reprod.* 2000, 15: 1140-1148.
8. Ball G.D., Leibfried M.L., Lenz R.W., Ax R.L., Bavister B.D., First N.L. Factors affecting successful in vitro fertilization of bovine follicular oocytes. *Biol. Reprod.* 1983, 28: 717-725.
9. Bao B., Garverick H.A., Smith G.W., Smith M.F., Salfen B.E., Youngquist R.S. Changes in messenger ribonucleic acid encoding luteinizing hormone receptor, cytochrome P450 side chain cleavage, and aromatase are associated with recruitment and selection of bovine ovarian follicles. *Biol. Reprod.* 1997, 56: 1158-1168.
10. Bavister B.D., Leibfried M.L., Lieberman G. Development of preimplantation embryos of the golden hamster in a defined culture medium. *Biol. Reprod.* 1983, 28: 235-247.
11. Bettogowda A., Lee K.B., Smith G.W. Cytoplasmic and nuclear determinants of the maternal-to-embryonic transition. *Reprod. Fertil. Dev.* 2008, 20: 45-53.
12. Bianchi P.H.D., Serafini P., da Rocha A.M., Hassun P.A., da Motta E.L.A., Baruselli P.S., Baracat E.C. Follicular waves in the human ovary; a new physiological paradigm for novel ovarian stimulation protocols. *Reprod. Sci.* 2010, 17: 1067-1076.
13. Bjercke S., Tanbo T., Abyholm T., Omland A., Opjen H.K., Fedorcsak P. Clinical outcome following stimulation with highly purified hMG or recombinant FSH in patients undergoing their first treatment cycle of IVF or ICSI. *Acta Obstet. Gynecol. Scand.* 2010, 89: 1053-1060.
14. Bouquet M., Selva J., Auroux M. The incidence of chromosomal abnormalities in frozen-thawed mouse oocytes after in vitro fertilization. *Hum. Reprod.* 1992, 7: 76-80.
15. Caixeta E.S., Machado M.F., Ripamonte P., Price C., Buratini J. Effects of FSH on the expression of receptors for oocyte-secreted factors and members of the EGF-like family during in vitro maturation in cattle. *Reprod. Fertil. Dev.* 2012, 25: 890-899.

16. Calder M.D., Caveney A.N., Westhusin M.E., Watson A.J. Cyclooxygenase-2 and prostaglandin E2 (PGE2) receptor messenger RNA<sub>s</sub> are affected by bovine oocyte maturation time and cumulus-oocyte complex quality, and PGE2 induces moderate expansion of the bovine cumulus in vitro. *Biol. Reprod.* 2001, 65: 135-140.
17. Carroll J., Jones K.T., Whittingham D.G. Ca<sup>2+</sup> release and the development of Ca<sup>2+</sup> release mechanisms during oocyte maturation. *Rev. Reprod.* 1996, 1: 137-143.
18. Carroll J., Warnes G.M., Matthews C.D. Increase in digyny explains polyploidy after in vitro fertilization of frozen-thawed mouse oocytes. *J. Reprod. Fert.* 1989, 85: 489-494.
19. Carvalho P.D., Hackbart K.S., Bender R.W., Baez G.M., Dresch A.R., Guenther J.N., Souza A.H., Fricke P.M. Use of a single injection of long-acting recombinant bovine FSH to superovulate Holstein heifers: a preliminary study. *Theriogenology*. 2014, 82: 481-489.
20. Chen L., Mao S.J.T., Larsen W.J. Identification of a factor in fetal bovine serum that stabilizes the cumulus extracellular matrix. *J. Biol. Chem.* 1992, 267: 12380-12386.
21. Chen L., Wert S.E., Hendrix E.M., 54
22. Russel P.T., Cannon M., Larsen W.J. Hyaluronic acid synthesis and gap junction endocytosis are necessary for normal expansion of the cumulus mass. *Mol. Reprod. Dev.* 1990, 26: 236-247.
23. Coomarasamy A., Afnan M., Cheema D., van der Veen F., Bossoyt P.M., van Wely M. Urinary hMG versus recombinant FSH for controlled ovarian hyperstimulation following an agonist long down-regulation protocol in IVF or ICSI treatment: a systematic review and meta-analysis. *Human Reproduction*. 2008, 23: 310-315.
24. Dyban A.P. *The early development of mammals*. Leningrad: Nauka Publ., 1988, 228 p.
25. Eppig J.J. Gonadotropin stimulation of the expansion of cumulus oophori isolated from mice: general conditions for expansion in vitro. *J. Exp. Zool.* 1979, 208: 111-120.
26. Eppig J.J. Coordination of nuclear and cytoplasmic oocyte maturation in eutherian mammals. *Reprod. Fertil. Dev.* 1996, 8: 485-489.
27. Eppig J.J., Wigglesowth K., O'Brien M.J. Comparison of embryonic developmental competence of mouse oocytes grown with and without serum. *Mol. Reprod. Dev.* 1992, 32: 33-40.
28. Frydman R., Howles C.M., Fruong F. A double-blind, randomized study to compare recombinant human follicle stimulating hormone (FSH; Gonal-F) with highly purified urinary FSH (Metrodin HP) in women undergoing assisted reproductive techniques including intracytoplasmic sperm injection. *Human Reproduction*. 2000, 15: 520-525.
29. Fujiwara T., Nakade K., Shirakawa H., Miyazaki S. Development of inositol trisphosphate-induced calcium release mechanisms during maturation of hamster oocytes. *Dev. Biol.* 1993, 156: 69-79.
30. Fukui Y., Ono H. Effects of sera, hormones and granulosa cells added to culture medium for in vitro maturation, fertilization, cleavage and development of bovine oocytes. *J. Reprod. Fertil.* 1989, 86: 501-506.
31. Fukushima M., Fukui Y. Effects of gonadotropins and steroids on the subsequent fertilizability of extrafollicular bovine oocytes cultured in vitro. *Anim. Reprod. Sci.* 1985, 9: 323-332.
32. Gilchrist R.B., Thompson J.G. Oocyte maturation: Emerging concepts and technologies to improve developmental potential in vitro. *Theriogenology*. 2007, 67: 6-15.
33. Gutnisky C., Dalvit G.C., Pintos L.N., Thompson J.G., Beconi M.T., Cetica P.D. Influence of hyaluronic acid synthesis and cumulus mucification on bovine oocyte in vitro maturation, fertilization and embryo development. *Reprod. Fertil. Dev.* 2007, 19: 488-497.
34. Furnus C.C., De Matos D.G., Moses D.F. Cumulus expansion during in vitro maturation of bovine oocytes: relationship with intracellular glutathione level and its role on subsequent embryo development. *Mol. Reprod. Dev.* 1998, 51: 76-83.
35. Harper K.M., Brackett B.G. Bovine blastocyst development after in vitro maturation in a defined medium with epidermal growth factor and low concentrations of gonadotropins. *Biol. Reprod.* 1993, 48: 409-416.
36. Herschman H.R. Review: prostaglandin synthase-2. *Biochim. Biophys. Acta.* 1996, 1299: 125-140.
37. Hirao Y. Conditions affecting growth and developmental competence of mammalian oocytes in vitro. *Anim. Sci. J.* 2011, 82: 187-197.
38. Inaba T., Mori J., Ohmura M. Baculovirus-insect cell production of bioactive porcine FSH. *Theriogenology*. 1997, 47: 491-499.
39. Ireland J.J., Roche J.F. Development of antral follicles in cattle after prostaglandin-induced luteolysis: changes in serum hormones, steroids in follicular fluid, and gonadotropin receptors. *Endocrinology*. 1982, 111: 2077-2086.

40. Izadyar F., Zeinstra E., Bevers M.M. Follicle stimulating hormone and growth hormone act differently on nuclear maturation while both enhance developmental competence of in vitro matured bovine oocytes. *Mol. Reprod. Dev.* 1998, 51: 339-345.
41. Jee B.C., Suh C.S., Kim Y.B., Kim S.H., Moon S.Y. Clinical efficacy of highly purified hMG versus recombinant FSH in IVF/ICSI cycles: a meta-analysis. *Gynecol. Obstet. Invest.* 2010, 70: 132-137.
42. Jinnó M., Sandow B.A., Iizuka R., Hodgen G.D. Full physiological maturation in vitro of immature mouse oocytes induced by sequential treatment with follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone. *In Vitro Fert. Embryo Transf.* 1990, 7: 285-291.
43. Keene J.L., Matzuk M.M., Otani T., Fauser B.C.J.M., Galway A.B., Hsueh A.J.W., Boime J. Expression of biologically active human follitropin in Chinese hamster ovary cells. *J. Biol. Chem.* 1989, 264: 4769-4775.
44. Keskinetepe L., Burnley C.A., Brackett B.G. Production of viable bovine blastocysts in defined in vitro conditions. *Biol. Reprod.* 1995, 52: 1410-1417.
45. Keskinetepe L., Brackett B.G. In vitro developmental competence of in vitro matured bovine oocytes fertilized and cultured in completely defined media. *Biol. Reprod.* 1996, 55: 333-339.
46. Kirienko K.V., Loginov A.G., Algulyan A.S., Smetanina I.G., Tatarinova L.V., Ryabykh V.P. [Production of cloned bovine embryos by somatic cell nuclear transplantation into enucleated oocytes matured in vitro]. *Sel'skokhosyaistvennaya biologiya - Agricultural Biology.* 2007, 4: 53-61.
47. Krisher R.L. In vivo and in vitro environmental effects on mammalian oocyte quality. *Annu. Rev. Anim. Biosci.* 2013, 1: 393-417.
48. Krivokharchenko A.S., Smetanina I.G., Tatarinova L.V. [Fertilization and development of cow's oocytes after abbreviated incubation with sperm]. *Ontogenez -Developmental Biology.* 2001, 4: 283-287.
49. Lazzari G., Wrenzycki C., Herrmann D., Duchi R., Kruip T., Niemann H., Galli C. Cellular and molecular deviations in bovine in vitro produced embryos are related to the large offspring syndrome. *Biol. Reprod.* 2002, 67: 767-775.
50. Leidenfrost S., Boelhaue M., Reichenbach M., Gungor T., Reichenbach H.D., Sinowatz F., Wolf E., Habermann F.A. Cell arrest and cell death in mammalian preimplantation development: lessons from the bovine model. *PLoS One.* 2011, 6: 1-13.
51. Leoni G., Bogliolo L., Pintus P., Ledda S., Naitana S. Sheep embryos derived from FSH/eCG treatment have a lower in vitro viability after vitrification than those derived from FSH treatment. *Reprod. Nutr. Dev.* 2001, 41: 239-246.
52. Lonergan P., Carolan C., Mermillod P. Development of bovine embryos in vitro following oocytes maturation under defined conditions. *Reprod. Nutr. Develop.* 1994, 34: 329-339.
53. Lopes da Costa L., Chagas e Silva J., Robalo Silva J. Superovulatory response, embryo quality and fertility after treatment with different gonadotropins in native cattle. *Theriogenology.* 2001, 56: 65-77.
54. Malhi P.S., Adams G.P., Singh J. Bovine model for the study of reproductive aging in women: follicular, luteal, and endocrine characteristics. *Biol. Reprod.* 2005, 73: 45-53.
55. Mannaerts B.M.J.L., de Leeuw R., Geelen J., Van Ravestein A., Van Wezenbeek P., Schuurs A., Kloosterboer H. Comparative in vitro and in vivo studies on the biological characteristics of recombinant human follicle-stimulating hormone. *Endocrinology.* 1991, 129: 2623-2630.
56. Maro B., Johnson M.J., Pickering S.J., Flach G. Changes in actin distribution during fertilization of the mouse egg. *J. Embryol. Exp. Morphol.* 1984, 81: 211-237.
57. Mehta T.S., Kiessling A.A. Development potential of mouse embryos conceived in vitro and cultured in ethylenediaminetetraacetic acid with or without amino acids or serum. *Biol. Reprod.* 1990, 43: 600-606.
58. Merriman J.A., Whittingham D.G., Carroll J. The effect of follicle stimulating hormone and epidermal growth factor on the developmental capacity of in vitro matured mouse oocytes. *Hum. Reprod.* 1998, 13: 690-695.
59. Moro F., Scarinci E., Palla C., Romani F., Familiari A., Tropea A., Leoncini E., Lanzzone A., Apa R. Highly purified hMG versus recombinant FSH plus recombinant LH in intrauterine insemination cycles in women >35years: a RCT. *Hum. Reprod.* 2015, 30: 179-185.
60. Newcomb R., Christie W.B., Rowson L.E.A. Birth of calves, after in vivo fertilization of oocytes removed from follicles and matured in vitro. *Vet. Rec.* 1978, 102: 461-462.
61. Nuttinck F., Peynot N., Humblot P., Massip A., Dessy F., Flechon J.E. Comparative immunohistochemical distribution of connexin 37 and connexin 43 throughout folliculogenesis in the bovine ovary. *Mol. Reprod. Dev.* 2000, 57: 60-66.
62. Perreault S.D., Barbee R.R., Slott V.L. Importance of glutathione in the acquisition and maintenance of sperm nuclear decondensing activity in maturing hamster oocytes. *Dev. Biol.* 1988, 125: 181-186.

63. Platteau P., Nyboe Andersen A., Loft A., Smitz J., Danglas P., Devroey P. Highly purified HMG versus recombinant FSH for ovarian stimulation in IVF cycles. *Reprod. Biomed. Online*. 2008, 17: 190-198.
64. Popova E., Krivokharchenko A., Ganten D., Bader M. Comparison between PMSG- and FSH-induced superovulation for the generation of transgenic rats. *Mol. Reprod. Dev.* 2002, 63: 177-182.
65. Rizos D., Ward F., Duffy P., Boland M.P., Lonergan P. Consequences of bovine oocyte maturation, fertilization or early embryo development in vitro versus in vivo: Implication for blastocyst yield and blastocyst quality. *Mol. Reprod. Dev.* 2002, 61: 234-248.
66. Roberts R., Iatropoulou A., Ciantar D., Stark J., Becker D., Franks S., Hardy K. Follicle-stimulating hormone affects metaphase I chromosome alignment and increases aneuploidy in mouse oocyte matured in vitro. *Biol. Reprod.* 2005, 72: 107-118.
67. Ryabykh V.P., Algulyan A.S., Loginov A.G., Kirienko K.V., Smetanina I.G., Tatarinova L.V. [The development in vitro of parthenogenetic and cloned cattle embryos using different methods of artificial cytoplasts activation]. *Sel'skokhosyaistvennaya biologiya - Agricultural Biology*. 2009, 4: 37-45.
68. Saeki K., Leibfried-Rutledge M.L., First N.L. Are fetal calf serum and hormones necessary during in vitro maturation of cattle oocytes for subsequent development? *Theriogenology*. 1990, 33: 316.
69. Saeki K., Hoshi M., Leibfried-Rutledge M.L., First N.L. In vitro fertilization and development of bovine oocytes matured in serum-free medium. *Biol. Reprod.* 1991, 44: 256-260.
70. Salustri A., Yanagishita M., Hascall V. Synthesis and accumulation of hyaluronic acid and proteoglycans in the mouse cumulus cell oocyte complex during follicle stimulating hormone induced mucification. *J. Biol. Chem.* 1989, 264: 13840-13847.
71. Schats R., Sutter P.D., Bassil S., Kremer J.A., Tournaye H., Donnez J. Ovarian stimulation during assisted reproduction treatment: a comparison of recombinant and highly purified urinary human FSH. On behalf of the Feronia and Apis study group. *Hum. Reprod.* 2000, 15: 1691-1697.
72. Sirard M.A., First N.L. In vitro inhibition of oocyte nuclear maturation in the bovine. *Biol. Reprod.* 1988, 39: 229-234.
73. Smetanina I.G., Tatarinova L.V. [Influence of the culture medium composition on oocyte maturation and bovine embryo development in vitro]. *Ontogenez -Developmental Biology*. 2000, 31(2): 139-143.
74. Smetanina I.G., Tatarinova L.V., Ryabykh V.P. In: *Materialy mezhdunarodnoi konferentsii: Sovremennye dostizheniya i problemy biotekhnologii sel'skokhozyaistvennykh zhivotnykh* (Proc. Intern. Conf.: Recent advances and problems in biotechnology of farm animals). Dubrovitsy: BIZh Publ, 2003, P. 134-136.
75. Smetanina I.G., Tatarinova L.V., Krivokharchenko A.S. [Fertilization of oocytes in vitro bovine cattle in protein-free culture system]. *Ontogenez -Developmental Biology*. 2006, 6: 438-443.
76. Smetanina I.G., Tatarinova L.V., Kirienko K.V., Algulyan A.S., Loginov A.G., Ryabykh V.P. [Using cow's eggs in protein-free culture system, as cytoplasts in cloning research]. *Problemy biologii produktivnykh zhivotnykh - Problems of Productive Animal Biology*. 2013, 2: 36-41.
77. Smetanina I.G., Tatarinova L.V., Krivokharchenko A.S. [Effect of hormones on bovine oocytes maturation in vitro]. *Byulleten' eksperimental'noi biologii i meditsiny - Bull. Exp. Biol. Med.* 2014, 5: 655-658.
78. Smetanina I.G., Tatarinova L.V., Krivokharchenko A.S. [The use of recombinant human follicle-stimulating hormone for bovine oocyte maturation in vitro]. In: *Materialy mezhdunarodnoi nauchno-prakticheskoi konferentsii: Puti prodleniya produktivnoi zhizni molochnykh korov na osnove optimizatsii razvedeniya, tekhnologii soderzhaniya i kormleniya zhivotnykh* (Proc. Intern. Conf.: Ways of extending productive life of dairy cows on the basis of optimization of breeding and feeding technologies). Dubrovitsy: VIZh Publ., 2015, P. 204-208.
79. Suss H., Wuthrich K., Stransinger J.G. Chromosome configurations and time sequence of the first meiotic division in bovine oocytes matured in vitro. *Biol. Reprod.* 1988, 38: 871-880.
80. Sutovsky P., Flechon J.E., Flechon B., Motlik J., Peynot N., Chesne P., Heyman Y. Dynamic changes of gap junctions and cytoskeleton during in vitro culture of cattle oocyte cumulus complexes. *Biol. Reprod.* 1993, 49: 1277-1287.
81. Sutton M.L., Gilchrist R.B., Thompson J.G. Effects of in vivo and in vitro environments on the metabolism of the cumulus-oocyte complex and its influence on oocyte developmental capacity. *Hum. Reprod. Update*. 2003, 9: 35-48.
82. Sutton-McDowall M.L., Gilchrist R.B., Thompson J.G. Cumulus expansion and glucose utilization by bovine cumulus-oocyte complexes during in vitro maturation: the influence of glucosamine and follicle-stimulating hormone. *Reproduction*. 2004, 128: 313-319.
83. Tajik P., Niwa K. Effects of caffeine and/or heparin in a chemically defined medium with or without glucose on in penetration of bovine oocytes and their subsequent development. *Theriogenology*. 1998, 49: 771-777.

84. Tajik P., Wang W., Okuda K., Niwa K. In vitro fertilization of bovine oocytes in a chemically defined, protein-free medium varying the bicarbonate concentration. *Biol. Reprod.* 1994, 50: 1231-1237.
85. Takagi M., Kim J.H., Izadyar F., Hyttel P., Bevers M.M., Dieleman S.J., Hendriksen P.J.M., Vos P.L. Impaired final follicular maturation in heifers after superovulation with recombinant human FSH. *Reproduction.* 2001, 121: 941-951.
86. Tervit H.R., Whittingham D., Rowson L. Successful culture in vitro of sheep and cattle ova. *J. Reprod. Fertil.* 1972, 30: 493-497.
87. Van De Sandt J.J.M., Schroeder A.C., Eppig J.J. Culture media for mouse oocyte maturation affect subsequent embryonic development. *Mol. Reprod. Dev.* 1990, 25: 164-171.
88. Van Wezenbeek P., Draaijer J., van Meel F., Olijve W. Recombinant follicle-stimulating hormone I. Construction, selection and characterization of a cell line. In: *From Clone to Clinic, Developments in Biotechnology.* Dordrecht: Kluwer Academic Publ., 1990, Vol. 1, P. 245-251.
89. Webb M., Howlett S.K., Maro B. Parthenogenesis and cytoskeletal organization in ageing mouse eggs. *J. Embryol. Exp. Morphol.* 1986, 95: 131-145.
90. Wilson J.M., Jones A.L., Moore K., Looney C.R., Bondioli K.L. Superovulation of cattle with a recombinant-DNA bovine follicle-stimulating hormone. *Anim. Reprod. Sci.* 1993, 33: 71-82.
91. Wrenzycki C., Herrmann D., Lucas-Hahn A., Korsawe K., Lemme E., Niemann H. Messenger RNA expression patterns in bovine embryos derived from in vitro procedures and their implications for development. *Reprod. Fertil. Dev.* 2005, 17: 23-35.
92. Wrenzycki C., Stinshoff H. Maturation environment and impact on subsequent developmental competence of bovine oocytes. *Reprod. Dom. Anim.* 2013, 48 (Suppl.): 38-43.
93. Ye H., Huang G., Pei L., Zeng P., Luo X. Outcome of in vitro fertilization following stimulation with highly purified hMG or recombinant FSH in downregulated women of advanced reproductive age: a prospective, randomized and controlled trial. *Gynecol. Endocrinol.* 2012, 28: 540-544.
94. Younis A.J., Brackett B.G., Fayer-Hosken R.A. Influence of serum and hormones on bovine oocyte maturation and fertilization in vitro. *Gamete Res.* 1989, 23: 189-201.
95. Ziebe S., Lundin K., Janssens R., Helmaard L., Arce J.C. Influence of ovarian stimulation with HP-hMG or recombinant FSH on embryo quality parameters in patients undergoing IVF. *Hum. Reprod.* 2007, 22: 2404-2413.
96. Zuelke K.A., Brackett B. Luteinizing hormone-enhanced in vitro maturation of bovine oocytes with and without protein supplementation. *Biol. Reprod.* 1990, 43: 784-787.

**Research on the development of culture systems for bovine oocyte maturation *in vitro*: current status and prospects**

<sup>1</sup>Smetanina I.G., <sup>2</sup>Krivoharchenko A.S.

<sup>1</sup>*Institute of Animal Physiology, Biochemistry and Nutrition, Borovsk Kaluga oblast, Russian Federation;* <sup>2</sup>*Institute of Semenov Chemical Physics RAS, Moscow, Russian Federation*

**ABSTRACT.** The aim is systematization of literature and authors research data on a number of aspects, including the assessment of the possibility of cows oocyte maturation *in vitro* in protein-free mediums, the use of different hormonal schemes for *in vitro* oocytes maturation, maturation of oocytes *in vitro* using different preparations of follicle stimulating hormone, as well as the possibility of oocyte *in vitro* maturation medium without hormones. Reproducible and reliable systems for mass production of cattle embryos is currently available in many laboratories around the world. Oocytes cultured *in vitro* (collected at slaughter with the use of transvaginal ultrasound or by aspiration in live animals) after 24-28 hours of incubation, give the percentage of nuclear maturation of the order 80-90%. In the process of *in vitro* fertilization by sperm capacitated by heparin, the normal penetration is achieved at a level of 50-60% with frequency of parthenogenetic activation and polyspermy in the range of 10-15% and 5-10%, respectively. Cultivating presumptive zygotes *in vitro*, one can get up to 40% of blastocysts. On the other hand, the quality of such embryos is inferior in comparison to embryos obtained *in vivo* and even to zygotes cultured in sheep oviducts, including decreased morphological characteristics and increased sensitivity during freezing. There are also a higher percentages of fetal loss after nonsurgical transplantation of embryos obtained *in vitro*, which may be due to placental defects. In general, these deficiencies pose a serious obstacle to a more efficient use of *in vitro* produced embryos in programs for breeding cattle, which assumes the use of modern reproductive technologies, including production of twins, cloning and transgenesis. Therefore, there is a problem in how to improve the viability of *in vitro* produced embryos and to ensure a satisfactory level of live descendants birth rate. For successful implementation of biotechnology programs, as well as for the purposes of fundamental research on embryos, it is necessary to create optimal culture systems providing a full maturation of oocytes outside the body. To solve this problem, it is advisable to search for the maximal defined media containing no protein components and other ingredients of natural origin which can cause distortion of the experimental results. When using eggs in transgenesis and cloning programs, maturation medium may be saturated with various additional components, but it is necessary to carry out their thorough pre-testing.

*Key words: oocyte maturation in vitro, hormones, cattle, preimplantation embryos*

**Problemy biologii produktivnykh zhivotnykh - Problems of Productive Animal Biology, 2017, 1: 28-53**

*Поступило в редакцию: 04.10.2016*

*Получено после доработки: 15.02.2017*

**Сметанина Ирина Геннадьевна**, ст.н.с., к.б.н., т. 8(961)006-90-49; sme.irina2011@yandex.ru;  
**Кривохарченко Александр Сергеевич**, н.с., к.б.н., т. 8(915)002-84-50