

ВЛИЯНИЕ СЫВОРОТКИ КРОВИ НА СОЗРЕВАНИЕ ООЦИТОВ И РАЗВИТИЕ ЭМБРИОНОВ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА *in vitro*

Сметанина И.Г., Татарина Л.В.

*ВНИИ физиологии, биохимии и питания сельскохозяйственных животных, Боровск
Калужской обл., Российская Федерация*

Цель работы исследование способности ооцитов КРС к ядерному созреванию *in vitro* при культивировании в среде с различными концентрациями фетальной сыворотки телят (FCS) КРС и выяснение характера влияния эстральной сыворотки коровы (ECS) на развитие *in vitro* оплодотворенных яйцеклеток КРС. Изучали способность ооцитов КРС к возобновлению мейоза и достижению стадии метафазы II в среде ТМС-199 с различными концентрациями фетальной сыворотки телят, а также характер влияния эстральной сыворотки на развитие *in vitro* оплодотворенных ооцитов в зависимости от времени её включения в синтетическую жидкость яйцевода, содержащую бычий сывороточный альбумин. В первой серии экспериментов показано, что в группах с 5 и 20% фетальной сыворотки мейоз возобновлял одинаковый процент ооцитов (93.4 и 93.2%, соответственно), но в группе с низкой концентрацией фетальной сыворотки все ооциты оставались на стадии метафазы I даже после 42 ч созревания *in vitro*, в то время как добавление 20% FCS позволило получить 51.7% ооцитов на стадии метафазы II. Затем оценивали ядерное созревание ооцитов КРС в среде с 10% и 20% фетальной сыворотки (лот сыворотки и среда те же самые, что и в предыдущих опытах). Между группами не наблюдали существенной разницы по проценту ооцитов, достигших стадии метафазы II (31.5 и 26.8%, соответственно). Во второй серии экспериментов изучали влияние времени включения эстральной сыворотки в культуральную среду (синтетическую жидкость яйцевода) на развитие эмбрионов крупного рогатого скота *in vitro*. Полученные результаты показывают, что ECS не оказывает ингибирующего влияния на первое деление дробления эмбрионов КРС. Но более позднее внесение ECS в культуральную среду (через 22 часа после начала культивирования), позволяет получить значительно больше эмбрионов на стадии бластоцисты и вылупившейся бластоцисты.

Ключевые слова: ооциты крупного рогатого скота, созревание in vitro, культивирование in vitro, сыворотка крови крупного рогатого скота

Проблемы биологии продуктивных животных, 2018, 3: 45-53

Применяемые сокращения: FCS (fetal calf serum) – фетальная сыворотка телят; ECS (estrous cow serum) – эстральная сыворотка коровы; ОКК – ооцит-кумулюсные комплексы; SOF (synthetic oviduct fluid) – синтетическая жидкость яйцевода; BSA (bovine serum albumin) – бычий сывороточный альбумин

Введение

Почти во всех исследованиях по созреванию *in vitro* ооцитов млекопитающих основная среда дополняется сывороткой крови (Leibfried-Rutledge et al., 1986; Sanbuissho, Threlfall, 1988; Younis et al., 1989). Показано, что завершение ядерного и цитоплазматического созревания ооцитов крупного рогатого скота (КРС) может происходить и в отсутствие сыворотки (Suss et al., 1988; Сметанина и др., 2000; Сметанина и др., 2006; Сметанина и др., 2014; Сметанина и др., 2017). Однако считается, что добавление этой составляющей в среду

созревания необходимо для последующего эффективного дробления и развития эмбрионов до стадии бластоцисты (Lonergan et al., 1994).

По данным многих авторов, созревание ядра ооцитов млекопитающих также может зависеть от сыворотки, вводимой в культуральную систему. Показано (Vanderhyden, Armstrong, 1989), что сыворотка ускоряет выделение первого полярного тельца в ооцитах крыс. Однако продемонстрировано (Saeki et al., 1990, 1991), что добавление фетальной сыворотки телят с гормонами или без гормонов к среде TCM-199 не повышает процент ядерного созревания ооцитов КРС. Установлено (Younis et al., 1989), что эстральная сыворотка коровы значительно повышает процент ядерного созревания ооцитов КРС по сравнению с FCS, дополненной гормонами. В то же время выяснено (Fukui, Ono, 1989; Sanbuissho, Threlfall, 1988), что тип сыворотки практически не сказывался на проценте ядерного созревания ооцитов КРС.

Несмотря на довольно значительное количество работ, посвященных изучению влияния сыворотки на созревание ооцитов млекопитающих, остаётся невыясненным еще целый ряд вопросов, которые необходимо уточнить. Одним из них является выбор оптимальной концентрации сыворотки в среде созревания. Так, по данным американских авторов (Leibfreid-Rutledge et al., 1986), FCS в концентрации 0.1% или 1.0% не поддерживала жизнеспособность и созревание ооцитов КРС и хомячков по сравнению с более высокими концентрациями (5, 10 или 20%). Другие исследователи (Vanderhyden, Armstrong, 1989) испытывали влияние разных концентраций сыворотки крови крыс (5, 10, 15 и 20%) в среде созревания на оплодотворяемость ооцитов. Пропорция нормально оплодотворённых ооцитов повышалась с увеличением концентрации сыворотки и достигала максимума при 15%.

В то же время есть сообщения, посвященные изучению влияния сыворотки на дальнейшее развитие оплодотворённых *in vitro* ооцитов КРС. По мнению некоторых исследователей, сыворотка телят или FCS оказывает двойной эффект на развитие эмбрионов КРС *in vitro*, ингибируя первое деление дробления, но стимулируя компактизацию морул и образование бластоцист (Pinyorummintr, Bavister, 1991, 1994; Bavister et al., 1992). Причем, добавление в культуральную среду сыворотки телят или FCS показало, что тип сыворотки может влиять на результаты культивирования (Pinyorummintr, Bavister, 1994).

Цель данных исследований – сравнение способности ооцитов КРС к ядерному созреванию *in vitro* при культивировании в среде с различными концентрациями FCS КРС и выяснение характера влияния ECS на развитие *in vitro* оплодотворённых яйцеклеток КРС в зависимости от времени её включения в среде SOF (synthetic oviduct fluid), дополненную BSA (bovine serum albumin).

Материал и методы

Яичники доставляли с мяскокомбината в фосфатном буфере Дюльбекко (“ПанЭко”, Россия), содержащем 40 мкг/мл гентамицина, при температуре 25-30^oС в течение 2-3 часов. Ооцит-кумулюсные комплексы (ОКК) выделяли из антральных фолликулов диаметром 2-6 мм методом рассечения с использованием специального запатентованного устройства (Маленко и др., 1995). На культивирование отбирали ОКК 1 и 2 категорий по общепринятой морфологической классификации (de Loos et al., 1989). Эти категории ооцитов относили к морфологически нормальным, пригодным для культивирования.

В первой серии экспериментов по определению влияния концентрации FCS на ядерное созревание ооцитов КРС использовали среду TCM-199 (“Sigma”, США) с добавлением 5%, 10% или 20% FCS (“Flow”, Англия) и 3.75 мкг/мл ФСГ (“ФСГ-супер”, ООО “Агробиомед”, Россия). ОКК культивировали в микрокаплях, 20 ОКК на 100 мкл среды, под парафиновым маслом (“Fluka”, Швейцария). Культивирование проводили в течение 24 часов, газовая фаза – 5% CO₂ в воздухе.

Во второй серии экспериментов по изучению влияния времени включения сыворотки в среде культивирования оплодотворённых яйцеклеток для созревания ооцитов использовали

среду DMEM (“Sigma”, США), дополненную 1 мкг/мл (“ФСГ-супер”, ООО “Агробιοмед”, Россия). Чтобы исключить возможное влияние неопределенных белковых компонентов, мы не добавляли, бычий сывороточный альбумин к среде созревания (БСА). ОКК культивировали в микрокаплях, 20 ОКК на 100 мкл среды, под парафиновым маслом (Fluka, Швейцария). Культивирование проводили в течение 24 часов, газовая фаза – 5% CO₂ в воздухе.

Созревшие *in vitro* ооциты отмывали в среде Тироде (Bavister, Yanagimachi, 1977; Bavister et al., 1983) с 10 мМ буфера HEPES (Т-Н), дополненную 3 г/л БСА (А 4919, “Sigma”, США) и помещали для совместного инкубирования со сперматозоидами в 500 мкл среды оплодотворения (из расчета 10 ОКК на 50 мкл среды). ОКК культивировали в 4-х луночных чашках фирмы “Nunc” (Дания). В работе использовали сперму быка Финал британо-фризской породы. Для оплодотворения применяли среду Тироде с 25 мМ бикарбоната натрия (Bavister et al., 1989), дополненную 10 мкг/мл гепарина (“Fluka”, Швейцария) и 6 г/л БСА. В среде Тироде в качестве энергетического источника вместо глюкозы использовали 0.2 мМ пирувата натрия (“Serva”, Германия). Сперму готовили по методу “swim-up” (Parrish et al., 1986), используя среду BGM1 (Parrish et al., 1985) с добавлением 1 мМ пирувата и 6 г/л БСА. Гепарин добавляли в капли оплодотворения непосредственно перед внесением спермы. Концентрация сперматозоидов в среде оплодотворения составляла 3 млн/мл. Сперматозоиды и яйцеклетки совместно инкубировали в течение 20 часов с 5% CO₂ в воздухе.

Для оценки способности оплодотворенных ооцитов к дальнейшему развитию *in vitro* их помещали на культивирование в микрокапли объемом 50 мкл среды SOF (Tervit et al., 1972) без глюкозы, с заменимыми (по рецептуре MEM) и незаменимыми (по рецептуре Игла) аминокислотами, с добавлением 1 мМ глутамина, 0.5 мМ пирувата натрия, 3 г/л БСА и 20%-ной ECS, добавляемой в среду через 20 или 42 ч после начала оплодотворения. Культивирование осуществляли в течение 210 ч в атмосфере трехкомпонентной газовой смеси (90% N₂, 5% CO₂, 5% O₂). Через 2 суток в культуральную среду добавляли по 4 мМ глюкозы (“Serva”, Германия). Развитие эмбрионов оценивали во время добавления в среду SOF глюкозы. Подсчитывали процент дробящихся яйцеклеток и удаляли из микрокапель одноклеточные эмбрионы, а в момент завершения культивирования через 210 ч подсчитывали процент бластоцист и вылупившихся бластоцист.

Все используемые среды (созревания, оплодотворения, развития) дополняли гентамицином (“Pharmacia”, Болгария) из расчета 40 мкг/мл. Все этапы культивирования проводили в атмосфере абсолютной влажности при температуре 38.5 С°.

Результаты и обсуждение

В первой серии экспериментов изучали способность ооцитов КРС к достижению стадии метафазы II (МII) в среде с различной концентрацией FCS (табл. 1,2). Первоначально в трех повторных экспериментах сравнивали две концентрации FCS – 5 и 20% на ядерное созревание ооцитов КРС. Результаты оценивали путём приготовления цитологических препаратов (Tarkowski, 1966). В обеих группах отмечен одинаковый процент возобновления мейоза ооцитов (93.4 и 93.2%, соответственно), но в группе с низкой концентрацией FCS все ооциты оставались на стадии метафазы I (MI) даже после 42 ч созревания *in vitro* (ооциты этой группы снимали на цитологические препараты позднее), в то время как добавление 20% FCS позволило получить 51.7% ооцитов на стадии MII.

Затем также в трех повторяющихся экспериментах оценивали ядерное созревание ооцитов КРС в среде с 10 и 20% FCS (лот сыворотки и среда та же самая, что и в предыдущих опытах). В качестве критерия завершения первого мейотического деления использовали визуально определяемое первое направительное тельце. Между группами не наблюдали достоверной разницы по проценту ооцитов, достигших MII (31.5% и 26.8%, соответственно).

Во второй серии экспериментов (табл. 3) изучали влияние времени включения ECS в культуральную среду на развитие эмбрионов КРС *in vitro*. Зиготы контрольной группы

культивировали в среде SOF с ECS, добавляемой сразу в начале культивирования (20 ч после начала оплодотворения). Эмбрионы опытной группы переносили в среду с сывороткой на 22 ч позднее, после первого деления дробления (42 ч после начала оплодотворения).

Таблица 1. Влияние концентрации фетальной сыворотки (5% и 20%) в среде культивирования на ядерное созревание ооцитов крупного рогатого скота *in vitro*

Группа	Число ооцитов, идентифицированных на цитологических препаратах	Из них					
		МП		МІ		ЗП	
		п	%	п	%	п	%
5% FCS	76	0	0 ^a	71	93.4 ^a	5	6.6
20% FCS	89	46	51.7 ^b	37	41.5 ^b	6	6.8

Примечания: приведены объединённые данные по трём опытам, достоверность различий определена в пределах колонок (^{a,b} P<0.001); ЗП – зародышевый пузырек.

Таблица 2. Влияние концентрации фетальной сыворотки (10% и 20%) в среде культивирования на ядерное созревание ооцитов крупного рогатого скота *in vitro*.

Группа	Число ооцитов, всего	Из них с НТ	
		п	%
10% FCS	108	34	31.5
20% FCS	123	33	26.8

Примечания: приведены объединённые данные по трём опытам; НТ – первое направленное тельце.

Полученные результаты показывают, что ECS не оказывает ингибирующего влияния на первое деление дробления эмбрионов КРС, но более позднее внесение ECS в культуральную среду, – через 22 ч после начала культивирования, позволяет получить значительно больше эмбрионов на стадии бластоцисты и вылупившейся бластоцисты.

Таблица 3. Влияние времени добавления эстральной сыворотки в среду культивирования на развитие эмбрионов крупного рогатого скота *in vitro*

Группы	Число ооцитов	Дробящихся, %	Количество эмбрионов, развившихся до стадии:			
			Бластоцисты, %		Вылупившиеся бластоцисты, %	
			От общего числа ооцитов	От числа дробящихся эмбрионов	От общего числа ооцитов	От числа дробящихся эмбрионов
Контроль	153	32.7	6.5 ^a	20 ^a	2 ^a	6 ^a
Опыт	153	37.9	17.8 ^b	46.6 ^c	9.2 ^d	24.1 ^e

Примечания: приведены объединённые данные по трём опытам; а- контроль; b-e – опыт. Достоверность различий определена в пределах колонок. ^{a,b} P<0.01. ^{a,c; a,d} P<0.001; ^{a,e} P<0.05. В контроле ECS добавляли сразу в начале культивирования (20 ч после начала оплодотворения), в опыте – на 22 ч позже, после первого деления дробления (42 ч после начала оплодотворения).

Как указывалось выше, концентрация сыворотки способна оказывать влияние на ядерное созревание ооцитов млекопитающих (Vanderhyden, Armstrong, 1989; Leibfreid-Rutledge et al., 1986), что подтверждается и результатами наших опытов. Известно, что доимплантационные эмбрионы млекопитающих, в частности мышей, могут взаимодействовать между собой в культуре за счет факторов, которые сами же эмбрионы высвобождают в среду. Концентрация данного фактора в среде, определяемая соотношением количества эмбрионов к объёму среды, влияет на развитие эмбрионов мышей до

преимплантационных стадий. Сыворотка, по-видимому, компенсирует недостаток этого фактора при культивировании *in vitro*, т.е., вероятно, содержит подобный фактор в своем составе (Кривохарченко и др., 1993). В наших опытах по созреванию ооцитов с различными концентрациями FCS соотношение эмбрионов к объему среды составило 1:50. Возможно, при таком соотношении в среде созревания ооцитов нарабатывается слишком малая концентрация фактора, необходимого для завершения полноценного ядерного созревания. Сыворотка в концентрации 5% не позволяет восполнить недостаток данного фактора при выбранных условиях культивирования, тогда как 10% FCS в той же мере, как и 20% FCS, уже позволяет группе ооцитов завершить первое мейотическое деление.

Показано, что в процессе созревания ооцитов КРС *in vitro* наблюдаются изменения в белковом синтезе, в частности, перед выделением первого полярного тельца, при переходе от МІ к МІІ (Kastrop et al., 1990b). Полученные нами результаты показывают, что концентрация сыворотки может оказывать определенное влияние на созревание ядра ооцитов КРС до МІІ; вместе с тем концентрация сыворотки не оказывала влияния на процент ооцитов, возобновивших мейоз в культуре *in vitro*, т.е. присутствие обсуждаемого фактора не сказывается на процессе разрушения зародышевого пузырька.

В состав как простых, так и сложных сред для культивирования эмбрионов КРС, как правило, включают сыворотку, что увеличивает процент зародышей, развившихся до стадии бластоцисты и улучшает качество сформировавшихся бластоцист (Pinyorummintr, Bavister, 1994; Rorie et al., 1994; Carolan et al., 1995; Yoshioka et al., 1997). Вместе с тем, как отмечалось выше, было показано, что сыворотка КРС оказывает двухфазное действие на развитие эмбрионов *in vitro*, ингибируя первое деление дробления и стимулируя образование морул и бластоцист в сложной среде TCM199 (Pinyorummintr, Bavister, 1991, 1994; Bavister et al., 1992).

В обсуждаемых опытах не наблюдали ингибирующего действия ЭКС на первое деление дробления, но более позднее внесение ЭКС в культуральную среду существенно увеличивало процент эмбрионов, развившихся до стадии бластоцисты и вылупившейся бластоцисты. Следует отметить, что новизна проведенных исследований заключается именно в выбранном типе сыворотки.

Как было показано, тип сыворотки может влиять на результаты культивирования (Pinyorummintr, Bavister, 1994). Поэтому отличие полученных данных от вышеприведенных могло быть обусловлено какими-либо особенностями самой ЭКС, которая, скорее всего, отличается от других видов сывороток, например, содержанием гормонов, ростовых факторов или других биологически активных веществ. Другое объяснение связано с использованием нами в качестве макромолекул БСА, который обладает выраженной способностью связывать различные вещества. Можно допустить, что он также способен отчасти связывать сывороточные факторы, ингибирующие первое деление дробления.

Таким образом, установлено, что: 1) концентрация FCS в среде культивирования оказывает влияние на ядерное созревание ооцитов КРС при переходе от стадии МІ к МІІ, но не влияет на процесс разрушения зародышевого пузырька; 2) ЭСК не ингибирует первое деление дробления эмбрионов КРС, но более позднее внесение ЭКС в культуральную среду, через 22 ч после начала культивирования, позволяет получить значительно больше эмбрионов преимплантационных стадий.

ЛИТЕРАТУРА

1. Кривохарченко А.С., Вильянович Л.И., Татарина Л.В., Рябых В.П. Развитие мышинных эмбрионов *in vitro* в среде без белка в зависимости от количества зародышей в микрообъеме среды // Онтогенез. – 1993. – № 6. – С. 53-60.
2. Маленко Г.П., Сметанина И.Г., Иванова Л.Б. Устройство для выделения ооцитов из яичников млекопитающих. – Патент РФ № 95100852, 1997.
3. 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. – № 2. – С. 139-143.
4. 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.
5. Сметанина И.Г., Татарина Л.В., Кривохарченко А.С. Влияние гормонов на созревание ооцитов крупного рогатого скота *in vitro* // Бюлл. эксперим. биологии и медицины. – 2014. – № 5. – С. 655-658.
6. Сметанина И.Г., Татарина Л.В., Кривохарченко А.С. Влияние гипоксантина в низких концентрациях на созревание и оплодотворение ооцитов крупного рогатого скота *in vitro* // Известия РАН. Серия биологическая. – 2017. – № 5. – С. 1-4.
7. 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. – С. 235-247.
8. Bavister B.D., Rose-Hellekant T., Pinyopummintr T. Development of *in vitro* matured/ *in vitro* fertilized bovine embryos into morulae and blastocyst in defined culture medium // Theriogenology. – 1992. – Vol. 28. – P. 127-146.
9. Bavister B.D., Yanagimachi R. The effect of sperm extract and energy sources on the motility and acrosome reaction of hamster sperm *in vitro* // Biol. Reprod. – 1977. – Vol. 16. – P. 228-237.
10. Carolan C., Lonergan P., Van Langendonck A., Mermillod P. Factors affecting bovine embryo development in synthetic oviduct fluid following oocyte maturation and fertilization // Theriogenology. – 1995. – Vol. 43. – P. 1115-1128.
11. De Loos F., van Vliet C., van Mauric P., Kruip Th. A.M. Morphology of immature bovine oocytes // Gam. Res. – 1989. – Vol. 24. – P. 197-204.
12. Fukui Y., Ono H. Effects of sera, hormones and granulose cells added to culture medium for *in vitro* maturation, fertilization, cleavage and development of bovine oocytes // J. Reprod. Fertil. – 1989. – Vol. 86. – P. 501-506.
13. Kastrop P.M.M., Bevers M.M., Destree O.H.J., Kruip Th.A.M. Changes in protein synthesis and phosphorylation patterns during bovine oocyte maturation *in vitro* // J. Reprod. Fert. – 1990b. – Vol. 90. – P. 305-310.
14. Leibfried-Rutledge M.L., Crister E.S., First N.L. Effects of fetal calf serum and bovine serum albumin on *in vitro* maturation and fertilization of bovine and hamster cumulus-oocyte complexes // Biol. Reprod. – 1986. – Vol. 35. – P. 850-857.
15. Lonergan P., Carolan C., Mermillod P. Development of bovine embryos *in vitro* following oocytes maturation under defined conditions // Reprod. Nutrit. Develop. – 1994. – Vol. 34. – P. 329-339.
16. Parrish J.J., Susko-Parrish J.L., First N.L. Effect of heparin and chondroitin sulfate on the acrosome reaction and fertility of bovine sperm *in vitro* // Theriogenology. – 1985. – Vol. 24. – P. 537-549.
17. Parrish J.J., Susko-Parrish J.L., Leibfried-Rutledge M.L. et al. Bovine *in vitro* fertilization with frozen-thawed semen // Theriogenology. – 1986. – Vol. 25. – P. 591-600.
18. Pinyopummintr T., Bavister B.D. *In vitro* – matured / *in vitro* – fertilized bovine oocytes can develop into morulae/blastocysts in chemically defined, protein-free culture medium // Biol. Reprod. – 1991. – Vol. 45. – P. 736-742.
19. Pinyopummintr T., Bavister B.D. Development of bovine embryos in a cell-free culture medium; effects of type of serum, timing of its inclusion and heat-inactivation // Theriogenology. – 1994. – Vol. 41. – P. 1241-1249.
20. Rorie R.W., Lester T.D., Miller et al. Effect of protein source and coculture on bovine embryo development in synthetic oviductal fluid medium // Theriogenology. – 1994. – Vol. 42. – P. 385-395.
21. 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.

22. 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.
23. Sanbuissho A., Threfall W.R. The influence of serum and gonadotropins on bovine oocyte maturation *in vitro* // *Theriogenology*. – 1988. – Vol. 29. – P. 301.
24. 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.
25. Tarkowski A.K. An air-drying method for chromosome preparation from mouse eggs // *Cytogenetics*. – 1966. – Vol. 5. – P. 394-400.
26. Tervit H.R., Whittingham D., Rowson I. Successful culture in vitro of sheep and cattle ova // *J. Reprod. Fertil.* – 1972. – Vol. 30. – P. 493-497.
27. Vanderhyden B.C., McLaughlin K.J., Rutledge J.M., Armstrong D.T. Using zona drilling to increase the penetrability of rat oocytes matured *in vitro* // *Biol. Reprod.* – 1989. –Vol. 40. – P. 953-960.
28. Yoshioka K., Othman., Tamiguchi T.et al. Differential pattern of blastulation in bovine morulae cultured in synthetic oviduct fluid medium containing FCS or BSA // *Theriogenology*. – 1997. – Vol. 48. – P. 997-1006.
29. Younis A.I., Brackett B.G., Fayrer-Hosken R.A. Influence of serum and hormones on bovine oocytes maturation and fertilization *in vitro* // *Gam. Res.* – 1989. – Vol. 23. – P. 189-201.

REFERENCES

1. 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.
2. Bavister B.D., Rose-Hellekant T., Pinyopummintr T. Development of in vitro matured/ in vitro fertilized bovine embryos into morulae and blastocyst in defined culture medium. *Theriogenology*. 1992, 28: 127-146.
3. Bavister B.D., Yanagimachi R. The effect of sperm extract and energy sources on the motility and acrosome reaction of hamster sperm *in vitro*. *Biol. Reprod.* 1977, 16: 228-237.
4. Carolan C., Lonergan P., Van Langendonck A., Mermillod P. Factors affecting bovine embryo development in synthetic oviduct fluid following oocyte maturation and fertilization. *Theriogenology*. 1995, 43: 1115-1128.
5. De Loos F., van Vliet C., van Mauric P., Kruip Th. A.M. Morphology of immature bovine oocytes. *Gam. Res.* 1989, 24: 197-204.
6. Fukui Y., Ono H. Effects of sera, hormones and granulose cells added to culture medium for in vitro maturation, fertilization, cleavage and development of bovine oocytes. *J. Reprod. Fertil.* 1989, 86: 501-506.
7. Kastrop P.M.M., Bevers M.M., Destree O.H.J., Kruip Th.A.M. Changes in protein synthesis and phosphorylation patterns during bovine oocyte maturation *in vitro*. *J. Reprod. Fert.* 1990, 90: 305-310.
8. Krivokharchenko A.S., Vil'yanovich L.I., Tatarinova L.V., Ryabykh V.P. [Development of mouse embryos in vitro in a medium without protein, depending on the number of embryos in the microvolume of the medium]. *Ontogenez -Developmental Biology*. 1993, 6: 53-60. (In Russian)
9. Leibfried-Rutledge M.L., Crister E.S., First N.L. Effects of fetal calf serum and bovine serum albumin on in vitro maturation and fertilization of bovine and hamster cumulus-oocyte complexes. *Biol. Reprod.* 1986, 35: 850-857.
10. Lonergan P., Carolan C., Mermillod P. Development of bovine embryos in vitro following oocytes maturation under defined conditions. *Reprod. Nutrit. Develop.* 1994, 34: 329-339.
11. Malenko G.P., Smetanina I.G., Ivanova L.B. *Ustroistvo dlya vydeleniya ootsitov iz yaichnikov mlekopitayushchikh* (Device for isolating oocytes from mammalian ovaries). Patent RF No. 95100852, 1997.
12. Parrish J.J., Susko-Parrish J.L., First N.L. Effect of heparin and chondroitin sulfate on the acrosome reaction and fertility of bovine sperm *in vitro*. *Theriogenology*. 1985, 24: 537-549.
13. Parrish J.J., Susko-Parrish J.L., Leibfried-Rutledge M.L. et al. Bovine in vitro fertilization with frozen-thawed semen. *Theriogenology*. 1986, 25: 591-600.
14. Pinyopummintr T., Bavister B.D. In vitro – matured / in vitro – fertilized bovine oocytes can develop into morulae/blastocysts in chemically defined, protein-free culture medium. *Biol. Reprod.* 1991, 45: 736-742.
15. Pinyopummintr T., Bavister B.D. Development of bovine embryos in a cell-free culture medium; effects of type of serum, timing of its inclusion and heat-inactivation. *Theriogenology*. 1994, 41: 1241-1249.

16. 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.
17. 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.
18. Smetanina I.G., Tatarinova L.V., Krivokharchenko A.S. [The effect of the composition of culture media on the maturation of oocytes and development of bovine embryos in vitro]. *Ontogenez -Developmental Biology*. 2000, 2: 139-143. (In Russian)
19. Smetanina I.G., Tatarinova L.V., Krivokharchenko A.S. [Fertilization of bovine oocytes in vitro in a protein-free culture system]. *Ontogenez -Developmental Biology*. 2006, 6: 438-443. (In Russian)
20. Smetanina I.G., Tatarinova L.V., Krivokharchenko A.S. [Effect of hormones on the maturation of bovine oocytes in vitro]. *Byulleten eksperimental'noi biologii i meditsiny – Bull. Exp. Biol. Med.* 2014, 5: 655-658. (In Russian)
21. Smetanina I.G., Tatarinova L.V., Krivokharchenko A.S. [Influence of hypoxanthin in low concentrations on maturation and fertilization of bovine oocytes in vitro]. *Izvestiya Rossiiskoi akademii nauk, seriya biologiya - Bulletin of the Russian Academy of Sciences, Series of Biology*. 2017, 5: 1-4. (In Russian)
22. Rorie R.W., Lester T.D., Miller et al. Effect of protein source and coculture on bovine embryo development in synthetic oviductal fluid medium. *Theriogenology*. 1994, 42: 385-395.
23. Sanbuissho A., Threfall W.R. The influence of serum and gonadotropins on bovine oocyte maturation in vitro. *Theriogenology*. 1988, 29: P. 301.
24. 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.
25. Vanderhyden B.C., McLaughlin K.J., Rutledge J.M., Armstrong D.T. Using zona drilling to increase the penetrability of rat oocytes matured in vitro. *Biol. Reprod.* 1989, 40: 953-960.
26. Tarkowski A.K. An air-drying method for chromosome preparation from mouse eggs. *Cytogenetics*. 1966, 5: 394-400.
27. Tervit H.R., Whittingham D., Rowson I. Successful culture in vitro of sheep and cattle ova. *J. Reprod. Fertil.* 1972, 30: 493-497.
28. Yoshioka K., Othman., Tamiguchi T. et al. Differential pattern of blastulation in bovine morulae cultured in synthetic oviduct fluid medium containing FCS or BSA. *Theriogenology*. 1997, 48: 997-1006.
29. Younis A.I., Brackett B.G., Fayrer-Hosken R.A. Influence of serum and hormones on bovine oocytes maturation and fertilization in vitro. *Gam. Res.* 1989, 23: 189-201.

**Effect of blood serum on oocyte maturation and development
of bovine embryos *in vitro***

Smetanina I.G., Tatarinova L.V.

*Institute of Animal Physiology, Biochemistry and Nutrition, Borovsk,
Kaluga oblast, Russian Federation*

ABSTRACT. The aim was to study the ability of cattle oocytes to nuclear maturation *in vitro* when cultured in a medium with different concentrations of fetal calf serum (FCS) and to ascertain the nature of the effect of estrous cow serum (ECS) on the development of *in vitro* fertilized egg cells in cattle. The capacity of the bovine oocytes for resumption of meiosis and the achievement of metaphase II in the medium of TCM-199 with different concentrations of fetal calf serum was studied and the pattern of influence of the estrous serum on the *in vitro* development of fertilized bovine oocytes, with special reference to the time of its inclusion to the synthetic fluid of the oviduct containing bovine serum albumin. In the first experimental series, it was shown that in the groups with 5% and 20% fetal serum meiosis resumed the same percentage of oocytes (93.4% and 93.2%, respectively), but in the group with a low concentration of fetal calf serum all oocytes remained at the metaphase I stage even after 42 hours of maturation *in vitro*, while the addition of 20% fetal calf serum allowed to obtain 51.7% oocytes at the metaphase II stage. Then nuclear maturation of bovine oocytes was evaluated in the medium with 10% and 20% of FCS (serum lot and medium are the same as in previous experiments). There was no significant difference in the percentage of oocytes reaching metaphase II (31.2 and 26.8%, respectively) between the groups. In the second experimental series, ECS was added to the culture medium within 20 hr (control) or 42 hr (experiment) after the beginning of fertilization. The estrous serum did not inhibit the first cleavage division (the percentage of cleaving embryos did not differ reliably: 32.7 and 37.9%, respectively). However, a later serum addition to the culture medium (within 42 h after the beginning of fertilization) reliably increased the percentage of embryos that reached the blastocyst stage (6.5% in the control and 17.8% in the experiment) and the hatched blastocyst (2 and 9.2%, respectively).

Keywords: bovine oocytes, in vitro maturation, in vitro cultivation, bovine blood serum

Problemy biologii produktivnykh zhivotnykh - Problems of Productive Animal Biology, 2018, 3: 45-53

Поступило в редакцию: 07.08.2018

Получено после доработки: 27.08.2018.

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

Татарина Людмила Викторовна, н.с.