

УДК: 636.2:591.39

DOI: 10.25687/1996-6733.prodanimbiol.2022.4.79-86

**ЭФФЕКТ ПОВЫШЕНИЯ КОМПЕТЕНЦИИ К ЭМБРИОНАЛЬНОМУ
РАЗВИТИЮ У ООЦИТОВ КОРОВ ПРИ ДВУХФАЗНОМ СОЗРЕВАНИИ
С ПОСЛЕДУЮЩИМ СТАРЕНИЕМ *in vitro***

Шедова Е.Н.

*ВИЖ им. Л.К. Эрнста – ФИЦ животноводства, Подольск - Дубровицы,
Московская обл., Российская Федерация*

Существующие протоколы экстракорпорального созревания (IVM, *in vitro* maturation) ооцитов коров не учитывают необходимость поддержания их устойчивости к возрастным трансформациям на завершающем этапе IVM. В данной работе проведено сравнительное исследование компетенции к эмбриональному развитию ооцитов коров, которые созревали в 1-фазной (1Ф) и 2-фазной (2Ф) системах IVM и перед экстракорпоральным оплодотворением старели *in vitro*. При использовании 1Ф системы IVM ооцит-кумулюсные комплексы (ОКК) культивировали в течение 24 ч в среде ТС-199, содержащей фетальную бычью сыворотку (ФБС), фолликулостимулирующий и лютеинизирующий гормоны. В 2Ф системе ооциты созревали в тех же условиях в течение первых 12 ч, а затем в новой среде без гормонов (ТС-199, ФБС) в течение 12 ч. После созревания в 1Ф и 2-Ф системах ОКК переносили в среду старения (ТС-199, ФБС) и проводили дополнительное культивирование в течение 10 ч, после чего подвергали экстракорпоральному оплодотворению и культивированию для эмбрионального развития. На 3-и сутки после оплодотворения ооцитов проводили морфологическую оценку раздробившихся зигот, на 7-е сутки культивирования оценивали число эмбрионов, развившихся до стадии бластоцисты, и их качество подсчётом общего числа ядер в эмбрионах с использованием метода цитологического анализа. Всего было проведено 5 независимых экспериментов. Количество ОКК в каждой экспериментальной группе варьировало от 165 до 169. Не было выявлено существенных различий между 1Ф и 2Ф группами по доле раздробившихся ооцитов, но обнаружено влияние условий созревания ооцитов на их развитие до стадии бластоцисты. При использовании 1Ф системы выход бластоцист составлял 11,7%; при переносе ОКК через 12 ч культивирования в среду 2Ф он увеличивался до 20,2 ($P < 0,01$). Использование двух сравниваемых протоколов IVM не изменяло качества (1) бластоцист. Заключение, что применение двухфазной системы созревания ооцитов с исключением из культуральной среды гонадотропных гормонов в последние 12 ч IVM, повышает устойчивость яйцеклеток к возрастным трансформациям, что способствует повышению их компетенцию к эмбриональному развитию после старения *in vitro*.

Ключевые слова: ооциты коров, in vitro, созревание, старение, эмбриональное развитие

Проблемы биологии продуктивных животных. 2022. 4: 79-86

Введение

Используемые обозначения: БСА – бычий сывороточный альбумин; ЛГ – лютеинизирующий гормон; ОКК – ооцит - кумулюсные комплексы; ППТ – первое полярное тельце; ФБС – фетальная бычья сыворотка; ФСГ – фолликулостимулирующий гормон; DAPI – 4',6-диамидино-2-фенилиндола (4',6-Diamidino-2-phenylindole dihydrochloride), FBS – fetal bovine serum. IVP (*in vitro* production) – получение эмбрионов *in vitro*; IVM (*in vitro* maturation) - созревание ооцитов *in vitro*;

Технология получения эмбрионов *in vitro* (IVP, *in vitro* embryo production), в сочетании с методом трансплантации эмбрионов рассматривается как один из надёжных и эффективных способов разведения высокопродуктивных и ценных особей, а также сохранения генетического потенциала редких и исчезающих пород (Galli et al., 2003; Ponsart et al., 2013; Зиновьева и др., 2020). Экстракорпоральное созревание ооцитов – важный этап технологии получения эмбрионов *in vitro*, оптимизацией которого можно существенно повысить её эффективность (Wrenzycki et al., 2013). Разработанные к настоящему времени протоколы культивирования и *in vitro* оплодотворения ооцитов коровы (*Bos taurus taurus*) позволяют получить достаточно высокий выход морул и

бластоцист, однако потенциал к эмбриональному развитию у созревших вне организма яйцеклеток по-прежнему остаётся значительно более низким, чем у яйцеклеток, созревших *in vivo* (Lonergan et al., 2008). Основным лимитирующим фактором, влияющим на полноценность IVP эмбрионов, является качество ооцитов, приобретаемое в процессе их созревания *in vitro* (IVM, *in vitro*, maturation,) (Кузьмина и др., 2001; Thompson et al., 2007; Wrenzycki et al., 2013). При этом условия IVM всё ещё остаются субоптимальными и требуют детализации.

В стандартной практике модернизация систем созревания направлена в первую очередь на моделирование условий, имеющих место *in vivo* в овариальных фолликулах (Кузьмина и др., 2001; Wrenzycki et al., 2013; Stroebach et al., 2015), однако используемые подходы, как правило, учитывают только изменения, происходящие в функциональном состоянии ооцитов в процессе их созревания. Вместе с тем в условиях *in vivo* и *in vitro* в ооцитах млекопитающих, включая коров, после завершения первого деления мейоза активизируются процессы старения, которые негативно влияют на качество созревших яйцеклеток и их компетенцию к эмбриональному развитию (Takahashi et al., 2011; Lebedeva et al., 2014). Кроме того, соматические клетки кумулюса, окружающие ооциты, подвергаются апоптотической дегенерации при завершении созревания женских гамет и могут ускорять негативные изменения последних, связанные с процессом старения (Lebedeva et al., 2014; Kong et al., 2018).

К настоящему времени выявлен ряд функциональных изменений, ассоциированных с процессом старения ооцитов коров, в том числе повышение предрасположенности к партеногенезу и апоптозу, а также возрастание частоты хромосомных нарушений (Lebedeva et al., 2014; Шедова 2020). Такие изменения в культивируемых яйцеклетках могут возникать до момента их активации и негативно влиять на качество получаемых эмбрионов (Singina et al., 2015), что свидетельствует о необходимости исследования механизмов, контролирующих данные процессы в условиях *in vitro*.

В условиях *in vitro* яйцеклетки, выделенные из разных фолликулов яичника и от разных коров – доноров, представляют собой гетерогенную популяцию, которая имеет разный потенциал к развитию в процессе созревания *in vitro*. В результате культивирования *in vitro*, часть ооцитов может созревать (достигать стадии метафазы II мейоза) значительно раньше, чем наступает период оплодотворения *in vitro*, что приводит к более раннему их старению, а также потере ими качества по сравнению с остальной популяцией созревающих клеток (Takahashi et al., 2013).

Следует также отметить, что для созревания ооцитов коров *in vitro* чаще используется однофазное культивирование. Тем не менее, данный подход не учитывает тот факт, что в период экстракорпорального созревания ооцитов млекопитающих существует временная несогласованность (асинхронность) между ядерными и цитоплазматическими преобразованиями, а основные цитоплазматические изменения, от которых в конечном итоге зависит способность ооцитов к эмбриональному развитию, происходят не на начальном, а на завершающем этапе IVM (Blanco et al., 2011); поэтому следует изучать специфические потребности женских гамет именно в этот период, в том числе с учётом возможных возрастных трансформаций.

Ранее было показано, что двухфазное культивирование ооцитов коров, в котором сначала используется система, содержащая гонадотропные гормоны, а затем ооциты переносят в новую среду, из которой они исключены, позволяет повышать качество IVP эмбрионов (Сингина и др., 2017). Такое улучшение может быть обусловлено благоприятными цитоплазматическими преобразованиями, происходящими на завершающем этапе созревания, поэтому предположили, что двухфазное культивирование в разных по составу средах на начальном и завершающем этапе созревания ооцитов может представлять собой альтернативный (дифференцированный) подход для получения эмбрионов *in vitro*, но для повышения его эффективности необходимы дальнейшие исследования (Сингина и др., 2017).

Цель данной работы – оценить целесообразность использования двухфазного культивирования (с заменой стандартной среды на втором этапе культивирования на среду, свободную от ФСГ, а также ЛГ) с точки зрения его влияния на устойчивость ооцитов к возрастным трансформациям в процессе созревания *in vitro* и на качество получаемых IVP эмбрионов. Задачей исследования была оценка компетенции к развитию у ооцитов коров, созревших в однофазной и двухфазной системах.

Материал и методы

Яичники коров, выделенные *post mortem*, доставляли в лабораторию, освобождали от прилегающих тканей и многократно отмывали в стерильном физиологическом растворе с антибиотиками (пенициллин, 100 МЕ/мл, стрептомицин, 50 мкг/мл). Ооцит-кумулясные комплексы (ОКК) выделяли из яичников, рассекая стенки фолликулов лезвием, промывали в среде ТС199, содержащей ФБС, 5%, гепарин, 10 мкг/мл, гентамицин, 50 мкг/мл, и проводили морфологическую оценку извлечённых ОКК. Для дальнейшего культивирования использовали ооциты округлой формы с гомогенной цитоплазмой, равномерной по ширине зоной пеллюцида, окружённые многослойным компактным кумулюсом. Все манипуляции с ооцитами осуществляли под стереомикроскопом при 37°C.

Отобранные по качеству ОКК культивировали с целью созревания группами в 500 мкл среды при температуре 38.5°C и 5% CO₂ в воздухе. Для получения созревших ооцитов применяли 1Ф и 2Ф системы культивирования. При использовании однофазной (1Ф) системы ОКК культивировали в течение 24 ч в среде ТС-199, содержащей фетальную бычью сыворотку (ФБС), 10%, пируват натрия, 0.5 мМ, гентамицин, 50 мкг/мл, ФСГ и ЛГ, по 10 мкг/мл. В двухфазной (2Ф) системе ооциты созревали в тех же условиях в течение первых 12 ч, затем ОКК пересаживали в новую среду и культивировали ещё 12 ч в отсутствие гормонов. В 1Ф и 2Ф системах культивирования ОКК после IVM переносили в среду старения ещё на 12 часов. На втором этапе двухфазного культивирования, а также при пролонгированном культивировании применяли среду ТС-199, содержащую ФБС, 10%, пируват натрия, 1 мМ и гентамицин, 50 мкг/мл.

После созревания и пролонгированного культивирования ОКК переносили в среду Fert-TALP (Parrish, 2014), дополненную гепарином, 10 мкг/мл, пенициламином, 20 мкМ, гипотаурином, 10 мкМ и эпинефрином, 1 мкМ для *in vitro* оплодотворения. Оплодотворение ОКК проводили с использованием заморожено-оттаянной спермы одного быка. Для этого за 1.5 ч до оплодотворения соломинки с замороженной спермой размораживали, и активные сперматозоиды получали методом swim-up (Singina et al., 2021) с использованием среды Sperm-TALP, содержащей пируват натрия, 1 мМ и бычьего сывороточного альбумина (БСА), 6 мг/мл (Parrish, 2014). Содержимое соломинок подслаивали по 220 мкл в 1.8 мл пробирки, содержащие 1 мл среды Sperm-TALP, и помещали в инкубатор на 50 минут. В конце инкубации из пробирок отбирали 750 мкл верхнего слоя с последующим его разбавлением свежей средой и центрифугированием при 300 g в течение 10 минут. Полученный после центрифугирования осадок, содержащий подвижные спермии, вносили в среду оплодотворения с предварительно перенесёнными в неё ОКК до конечной концентрации $1,5 \times 10^6$ сперматозоидов/мл.

In vitro созревание и оплодотворение ооцитов происходило в 4-х луночных планшетах в каплях среды объёмом 500 мкл, покрытых равным количеством лёгкого минерального масла. Культивирование проводили в условиях инкубатора при 38.5°C и 5% CO₂ в воздухе.

Половые клетки совместно культивировали в течение 15-16 ч, затем ооциты освобождали от клеток кумулюса и налипших сперматозоидов. Предполагаемые зиготы переносили в среду для развития эмбрионов. Культивирование происходило в условиях инкубатора в среде CR1, полностью покрытой лёгким минеральным маслом при температуре 38.5°C в присутствии 5% CO₂ в воздухе. Через 3-е суток после оплодотворения ооцитов проводили смену среды и морфологическую оценку раздробившихся зигот, на 7-е сутки культивирования оценивали число эмбрионов, развившихся до стадии бластоцисты, и их качество. Оценка последнего проводили на основе подсчёта общего числа ядер в эмбрионах с использованием цитологического анализа.

Для цитологического анализа 7-дневные эмбрионы фиксировали 4% раствором параформальдегида в натрий-фосфатном буфере в течение 60 мин при комнатной температуре. После фиксации эмбрионы пермеабелизировали в течение 30 мин в 0,1% растворе цитрата натрия, содержащем Тритон X-100, 5%, затем эмбрионы окрашивали в течение 20 мин раствором DAPI, 1 мкг/мл с целью локализации ядер, переносили на сухое обезжиренное стекло и заключали в среду Vectashield. Микрофотографирование и оценку препаратов выполняли под моторизованным микроскопом Axio Imager.M2 (Carl Zeiss, Германия), оснащённым флуоресцентной приставкой, с использованием программы ZEN 2 pro (Carl Zeiss, Германия).

Статистическую обработку данных проводили методом ANOVA. Результаты экспериментов представлены в виде средних значений (M) и стандартных ошибок ($\pm m$). Для оценки статистической значимости групповых различий использовали критерий Тьюки.

Результаты и обсуждение

В данной работе для изучения изменений, связанных со старением ооцитов была использована модель пролонгированного культивирования (Miao et al., 2009), согласно которой ОКК после периода созревания *in vitro* в обеих исследуемых системах (24 ч) были перед оплодотворением *in vitro* дополнительно культивированы еще в течение 12 ч.

Всего было проведено 5 независимых экспериментов. Не было выявлено существенных различий между 1Ф и 2Ф группами по доле раздробившихся ооцитов, но обнаружено влияние условий созревания ооцитов на их развитие до стадии бластоцисты. При использовании 1Ф системы выход бластоцист составлял $11,7 \pm 1,2\%$; при переносе ОКК через 12 ч культивирования в среду 2Ф он увеличивался до $20,2 \pm 2,5\%$ (табл. 1)

Компетентность зрелых ооцитов к развитию после оплодотворения *in vitro*, которая служит критерием их качества, оценивали по способности ооцитов вступать в первое деление дробления и достигать стадии бластоцисты. Результаты оценки представлены в табл. 2.

Таблица 1. Развитие IVP эмбрионов после созревания ооцитов коров в системах 1Ф и 2Ф и последующего старения *in vitro* в течение 12 ч (M±m).

Группы	Общее количество ооцитов	Доля раздробившихся ооцитов, %	Развилось до стадии бластоцисты	
			% от общего числа ооцитов	% от числа раздробившихся ооцитов
1Ф IVM	169	$62,2 \pm 5,1$	$11,7 \pm 1,2$	$19,7 \pm 2,6$
2Ф IVM	165	$70,1 \pm 5,0$	$20,2 \pm 2,5^{**}$	$29,0 \pm 2,1^*$

Примечание; * $P < 0,05$ по критерию Тьюки при сравнении 1Ф и 2Ф групп.

Таблица 2. Результаты цитологического анализа бластоцист, полученных после экстракорпорального оплодотворения (M±m).

Группы	Число экспериментов	Количество бластоцист	Среднее число ядер в бластоцистах, n
1Ф	5	20	$66,2 \pm 1,5$
2Ф	5	33	$68,4 \pm 2,7$

Использование двух сравниваемых протоколов созревания ооцитов существенно не изменяло качества IVP эмбрионов, которое оценивали по числу ядер на 7-е сутки после оплодотворения (фото 1. В, Г). Следует отметить, что старение негативно повлияло на данный показатель. Число ядер в эмбрионах на стадии бластоцисты было невысоким и составляло в среднем для 1Ф и 2Ф IVM 66 и 68 ядер соответственно.

Целесообразность применения двухфазного протокола IVM коров активно изучается в последние годы. Для решения проблемы асинхронности ядерного и цитоплазматического созревания, выделенные из фолликулов ОКК некоторое время культивируют в среде созревания с добавлением ингибиторов мейоза, а затем без них (Guemra et al., 2014). Однако цитоплазматические преобразования, от которых в конечном итоге зависит компетентность ооцитов к развитию, происходит не на начальном, а на завершающем этапе IVM, что указывает на необходимость определения специфических потребностей ооцитов именно в этот период (Funashi et al., 1993). Хотя однофазный протокол IVM, когда ооциты созревают до оплодотворения в одной среде в присутствии гормонов, традиционно используется большинством исследователей и способен поддерживать высокую компетентность яйцеклеток к дальнейшему развитию (Stroebech et al., 2015; Blanco et al., 2011), в нашем более раннем исследовании (Singina et al., 2017) он оказался сравним по эффективности получения эмбрионов доимплантационных стадий развития с двухфазной системой, предполагающей отсутствие гормонов ФСГ и ЛГ на завершающем этапе созревания ооцитов. Кроме того, использование описанного выше подхода положительно повлияло на качество полученных эмбрионов доимплантационных стадий развития. Следует отметить, что переход к двухфазной системе культивирования ооцитов свиней, предполагающей исключение гонадотропных гормонов во второй фазе дозревания, кардинальным образом изменил

эффективность всей технологии получения эмбрионов *in vitro* у этого вида животных (Funashi et al., 1993).

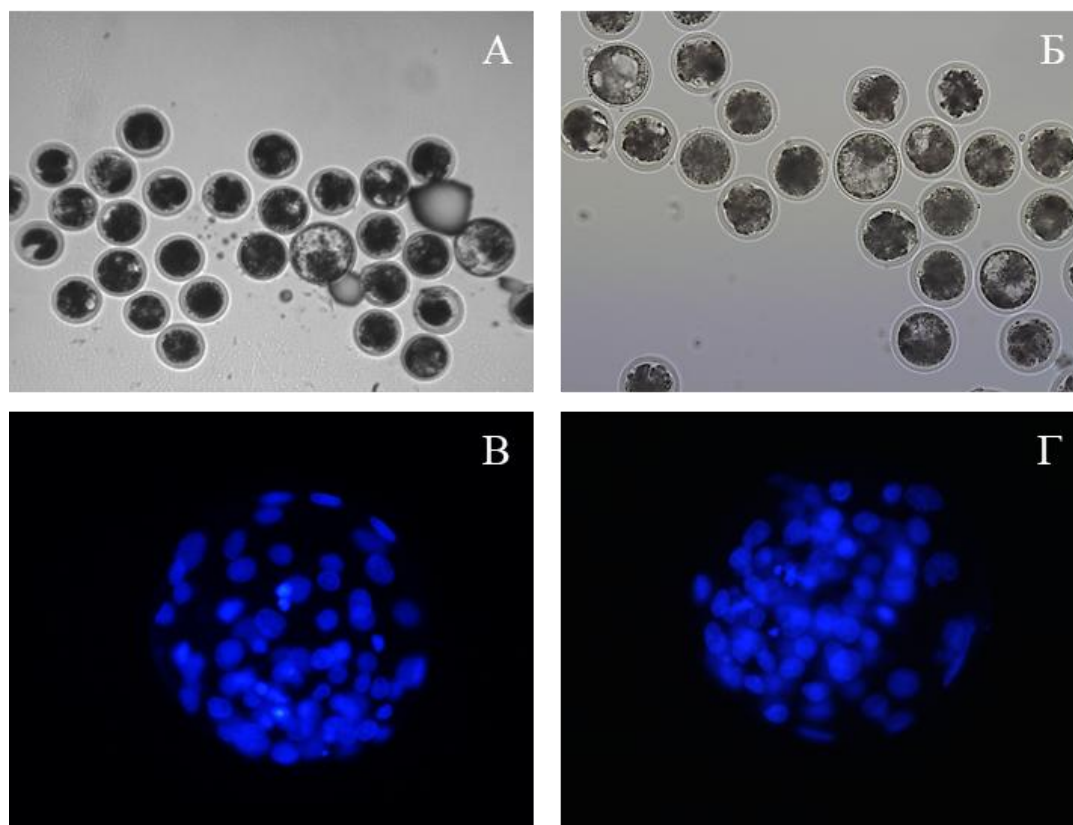


Фото 1. Микрофотографии эмбрионов, развившихся до стадии бластоцисты, после созревания ооцитов в системах 1Ф (А, В) и 2Ф (Б, Г) и последующего старения в течение 12 ч. А, Б – морфология эмбрионов на 7-е сутки культивирования (увеличение $\times 200$, микроскоп Eclipse TiU, «Nikon», Япония); В, Г – цитологические препараты бластоцист на 7-е сутки культивирования (окрашивание ядер в бластоцисте с DAPI, увеличение $\times 200$, флуоресцентный микроскоп Axio Imager.M2, «Carl Zeiss», Германия).

В данной работе исследовано долговременное влияние условий созревания ооцитов в двухфазной системе (с заменой стандартной среды IVM на втором этапе культивирования на среду, свободную от ФСГ, а также ЛГ); при этом обнаружено положительное влияние этого протокола на устойчивость ооцитов к возрастным изменениям. Показано, что по сравнению с 1Ф IVM, созревание в 2Ф системе усиливало способность ооцитов коров к эмбриогенезу после старения и оплодотворения *in vitro*. При этом характер влияния исследуемых условий IVM на ооциты, оплодотворённые через 24 ч созревания, выявленное в более раннем исследовании (Singina et al., 2017a), и на ооциты, подвергшихся старению после созревания (результаты данного исследования) существенно различается. В первом исследовании использование двухфазного протокола приводило к повышению числа ядер в эмбрионах на стадии бластоцисты, т.е. их качества (Singina et al., 2017 a), во втором данный эффект не проявлялся, а наблюдалось увеличение выхода бластоцист. Это даёт основание для предположения о различных механизмах влияния исследуемых условий на процессы созревания и старения ооцитов, что требует проведения дополнительных исследований.

У крупного рогатого скота изменения, ассоциированные со старением ооцитов, происходят постепенно. Первые признаки возрастных трансформаций ооцитов коров наступают через 16 ч, и они проявляются в начинающейся миграции ППТ относительно метафазной пластинки (Lebedeva et al., 2014; Шедова, 2020). Старение зрелых ооцитов также сопровождается постепенным нарастанием апоптотической дегенерации (Singina et al., 2017a) и деструктивных изменений в метафазных хромосомах, таких как слипание и деконденсация. Эти нарушения проявляются уже через 12 ч и нарастают в процессе старения ооцитов (Lebedeva et al., 2014). Напротив, огрубение

зоны пеллюцида (Lebedeva et al., 2016) и способность к естественной партеногенетической активации (Lebedeva et al., 2014) в стареющих яйцеклетках коров происходят медленнее, чем описанные выше изменения, и они становятся существенными у данного вида только через 48 ч пролонгированного культивирования. Недавние исследования на молекулярном уровне показали, что в стареющих ооцитах коров наблюдается увеличение поляризации митохондрий. В свою очередь, это приводит к повышению митохондриальной активности и продукции АТФ (Ivata et al., 2016; Kouyama et al., 2014). Слишком высокая митохондриальная активность может способствовать повышению уровня активных форм кислорода, ответственного за окислительный стресс, что отрицательно сказывается на качестве ооцитов.

За последнее десятилетие, несмотря на важность решения проблемы старения *in vitro* ооцитов коров, очень мало исследований, направленных на поиск регуляторов, снижающих возрастные трансформации яйцеклеток (Шедова, 2021). К настоящему времени показана возможность, по крайней мере, частичного торможения процессов старения при воздействии на ооциты коров дитиотреитола. Внесение данного вещества в среду пролонгированного культивирования снижает уровень апоптоза в зрелых ооцитах (Singina et al., 2017б). Также показано, что гипофизарный пролактин может специфически воздействовать на зрелый ооцит и повышать его устойчивость к процессам старения, в том числе связанным с потерей ооцитами компетенции к дальнейшему эмбриональному развитию (Singina et al., 2021). Использование данных факторов во второй фазе двухфазного созревания ооцитов может стать полезной модификацией технологии IVP в аспекте решения проблемы старения ооцитов в условиях *in vitro*.

Заключение

Полученные данные позволяют сделать вывод, что двухфазная система созревания ооцитов коров, предполагающая исключение из среды культивирования гонадотропных гормонов в последние 12 ч IVM, повышает устойчивость яйцеклеток к возрастным трансформациям и, как следствие, их компетенцию к эмбриональному развитию после старения *in vitro*.

Список литературы

1. Зиновьева Н.А., Полябин С.В., Чинаров Р.Ю. Вспомогательные репродуктивные технологии: история становления и роль в развитии генетических технологий в скотоводстве (обзор). // Сельскохозяйственная биология. 2020. Т. 55. № 2. С. 225-242. DOI: 10.15389/agrobiology.2020.2.225rus
2. Кузьмина Т.И., Лебедева И.Ю., Торнер Х. и др. Эффекты пролактина в различных системах культивирования на созревание ооцитов коров и их способность к дальнейшему развитию // Онтогенез. 2001. Т. 32. № 2. С. 140-147.
3. Сингина Г.Н., Лебедева И.Ю., Шедова Е.Н., Тарадайник Т.Е., Митяшова О.С., Цындрин Е.В., Данч С.С. Способность ооцитов коров к эмбриональному развитию при созревании в разных системах двухфазного культивирования. // Сельскохозяйственная биология. 2017. Т. 52. № 4. С. 776-784. DOI: 10.15389/agrobiology.2017.4.776rus
4. Шедова Е.Н. Особенности старения зрелых ооцитов коров в условиях *in vitro*. // Материалы XXVI международной научно-практической конференции «Повышение конкурентоспособности животноводства и задачи кадрового обеспечения». М., 2020. С. 187-192.
5. Шедова Е.Н. Старение яйцеклеток и его влияние на эффективность репродукции у домашних животных. // Материалы XXVII международной научно-практической конференции «Повышение конкурентоспособности животноводства и задачи кадрового обеспечения». МО, 2021. С. 205-209.
6. Funahashi H., Day B.N. Effects of the duration of exposure to hormone supplements on cytoplasmic maturation of pig oocytes *in vitro*. // J. Reprod. Fertil. 1993. Vol. 98. P. 179-185. DOI: 10.1530/jrf.0.0980179
7. Galli C., Duchi R., Crotti G., Turini P., Ponderato N., Colleoni S., Lagutina I., Lazzari G. Bovine embryo technologies. // Theriogenology. 2003. Vol. 59. nr 2. P. 599-616. DOI: 10.1016/S0093-691X(02)01243-8
8. Guemra S., da Silva Santo E., Zanin R., Monzani P.S., Sovernigo T.C., Ohashi O.M., Verde Leal C.L., Adona P.R. Effect of temporary meiosis block during prematuration of bovine cumulus-oocyte

- complexes on pregnancy rates in a commercial setting for in vitro embryo production. // *Theriogenology*. 2014. Vol. 81 nr 7. P.982-987. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2014.01.026
9. Ivata H. Age- associated events in bovine oocytes and possible countermeasure. // *Reprod. Med. Biol.* 2016. Vol. 15 nr 3. P. 155-164. DOI:10.1007/s12522-015-0233-5
 10. Kong Q.Q., Wang J., Xiao B., Lin F.H., Zhu J., Sun G.Y., Luo M.J., Tan J.H. Cumulus cell released tumor necrosis factor (TNF)- α promotes post-ovulatory aging of mouse oocytes. // *Aging (Albany NY)*. 2018. Vol. 10. nr 7. P. 1745-1757. DOI:10.18632/aging.101507.
 11. Koyama K., Kang S., Huang W., Yanagawa Y., Takahashi Y., Nagano M. Aging-related changes in in vitro-matured bovine oocytes: oxidative stress, mitochondrial activity and ATP content after nuclear maturation. // *J. Reprod. Dev.* 2014. Vol. 60. nr 2. P. 136–142. DOI: 10.1262/jrd.2013-115
 12. Lebedeva I. Yu., Singina G.N., Lopukhov A.V., Zinovieva N.A. Effects of cumulus cells and pituitary hormones on age-associated cellular changes during the prolonged culture of bovine oocytes. // *Reprod. Fertil. Dev.* 2014. Vol. 26. nr 1. P. 196.
 13. Lebedeva I. Yu., Singina G.N., Shedova E.N., Zinovieva N.A. Modulating the quality of bovine oocytes aging in vitro by cumulus cells and prolactin. // *Reprod. Domest. Anim.* 2016. Vol. 51. nr 5. P. 107.
 14. Lebedeva I. Yu., Singina G.N., Lopukhov A.V., Zinovieva N.A. Dynamics of morphofunctional changes in aging bovine ova during prolonged culture in vitro. // *Cell and Tissue Biology*. 2014. Vol. 8. nr 3. P. 258-266. DOI: 10.1134/S1990519X14030080
 15. Lonergan P., Fair T. In vitro-produced bovine embryos: dealing with the warts. // *Theriogenology*. 2008. Vol. 69. P. 17-22. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2007.09.007.
 16. Miao Y.L., Kikuchi K., Sun Q.Y., Schatten H. Oocyte aging: cellular and molecular changes, developmental potential and reversal possibility. // *Hum. Reprod. Update*. 2009. Vol. 15. P. 573-585. DOI: 10.1093/humupd/dmp014
 17. Parrish J.J. Bovine in vitro fertilization: in vitro oocyte maturation and sperm capacitation with heparin. // *Theriogenology*. 2014. Vol. 81. nr 1. P. 67-73. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2013.08.005
 18. Ponsart C., Bourhis D. L., Knijn H., Fritz S., Guyader-Joly C., Ottern T., Lacaze S., Charreaux F., Schibler L., Dupassieux D., Mullaart E. Reproductive technologies and genomic selection in dairy cattle. // *Reprod. Fertil. Dev.* 2013. Vol. 26. nr 1. P. 12-21. DOI: 10.1071/RD13328
 19. Singina G. N., Lebedeva I. Yu., Taradajnic T.E., Zinovieva N.A. Role of pituitary hormones and cumulus cells in modulating the developmental capacity of aging bovine oocytes. // *Reprod. Fertil. Dev.* 2015. Vol. 27. nr 1. P. 204.
 20. Singina G.N., Lebedeva I. Yu., Lopukhov A.V., Shedova E.N., Tsyndrina E.N., Litvinova V.V. Effect of prolactin and dithiothreitol during prolonged culture of aging oocytes on the development potential of parthenogenetic bovine embryos. // *Anim. Reprod.* 2017 a. Vol. 14. nr 3. P. 965.
 21. Singina G.N., Shedova E.N., Lopukhov A.V., Lebedeva I. Yu., Dunch S.S. Effects of the prolonged culture conditions on the apoptosis resistance and developmental competence of bovine oocytes. // *Reprod. Domest. Anim.* 2017 b. Vol. 52. nr 3. P. 135.
 22. Singina G.N., Shedova E.N., Lopukhov A.V., Mityashova O.S., Lebedeva I. Yu. Delaying effects of prolactin and growth hormone on aging processes in bovine oocytes matured in vitro. // *Pharmaceuticals*. 2021. Vol. 14. nr 7. P. 684. DOI: 10.3390/ph14070684)
 23. Stroebech L., Mazzoni G., Pedersen H.S., Freude K.K., Kadarmideen H.N., Callesen H., Hyttel P. In vitro production of bovine embryos: revisiting oocyte development and application of systems biology. // *Animal Reproduction*. 2015. Vol. 12. nr. 3. P. 465-472.
 24. Takahashi T., Igarashi H., Amita M., Hara S., Kurachi H. Cellular and molecular mechanisms of various types of oocyte aging. // *Reprod. Med. Biol.* 2011. Vol. 10. nr 4. P. 239-249. DOI: 10.1007/s12522-011-0099-0
 25. Takahashi T., Igarashi H., Amita M., Hara S., Matsuo K., Kurachi H. Molecular mechanism of poor embryo development in postovulatory aged oocytes: mini review. // *J. Obstet. Gynaecol. Res.* 2013. Vol. 39. nr 10. P. 1431-1439. DOI: 10.1111/jog.12111.
 26. Thompson J.G., Lane M., Gilchrist R.B. Metabolism of the bovine cumulus-oocyte complex and influence on subsequent developmental competence. // *Soc. Reprod. Fertil. Suppl.* 2007. Vol. 64. P. 179-190.
 27. Wrenzycki C., Stinshoff H. Maturation environment and impact on subsequent developmental competence of bovine oocytes. // *Reprod. Domest. Anim.* 2013. Vol. 48. nr 1. P. 38-43. DOI: 10.1111/rda.12204

References (for publications in Russian)

1. Zinovieva N.A., Pozyabin S.V., Chinarov R.Yu. [Assisted reproductive technologies: the history and role in the development of genetic technologies in cattle: a review]. *Sel'skokhozyaistvennaya biologiya (Agricultural biology)*. 2020. 55(2): 225-242. DOI: 10.15389/agrobiology.2020.2.225rus
2. Kuzmina T.I., Lebedeva I.Yu., Torner H., Alm X. [Effect of prolactin in different culture systems on bovine oocyte maturation and early embryonic development]. *Ontogenez (Developmental Biology)*. 2001. 32(2): 283-287.
3. Singina G.N., Lebedeva I.Yu., Shedova E.N., Taradajnic T.E., Mityashova O.S., Tsyndrina E.V., Danch S.S. [Bovine oocyte ability to embryonic development when maturing in different two phase culture systems]. *Sel'skokhozyaistvennaya biologiya (Agricultural biology)*. 2017. 52(4): 776-784. DOI: 10.15389/agrobiology.2017.4.776eng
4. Shedova E.N. [The peculiar features of matured bovine oocytes aging in vitro]. *Mat. Intern. XXVI Conf. "Improving the competitiveness of animal husbandry and staffing tasks"*. Moscow, 2020. P. 187-192.
5. Shedova E.N. [Aging oocytes and its influence on the efficiency of reproduction in domestic animals]. *Materialy XXVI mezhdunarodnoi nauchno-prakticheskoi konferentsii «Povyshenie konkurentosposobnosti zhivotnovodstva i zadachi kadrovogo obespecheniya» (Mat. Intern. XXVII Conf. "Improving the competitiveness of animal husbandry and staffing tasks")*. Moscow, 2021. P. 205-209.

UDC 636.2:591.39

Effect of increased developmental competence of bovine oocytes when maturing in two-phase culture systems and *in vitro* aging

Shedova E.N.

*Federal Research Center for Animal Husbandry, Ernst VIZh,
Podolsk - Dubrovitsy, Moscow oblast, Russian Federation*

ABSTRACT. The existing protocols *in vitro* maturation (IVM) of bovine oocytes do not take into account the need to maintain their sufficient resistance to age-related transformations at the final stage of IVM. In this work, a comparative study of the competence for embryonic development of bovine oocytes matured in 1-phase (1ph) and 2-phase (2ph) IVM systems and aged *in vitro* before *in vitro* fertilization was carried out. Using the 1ph IVM system, cumulus oocyte complexes (COCs) were cultured for 24 h in TC-199 medium, fetal bovine serum (FBS), follicle-stimulating and luteinizing hormones. In the 2ph system, oocytes matured under the same conditions for the first 12 h, and then in a new hormone-free medium (TC-199, FBS) for the next 12 h. After maturation in the 1ph and 2ph systems, COCs were transferred to the aging medium (TC-199, FBS) and further culture for another 10 hours, after which they were subjected to *in vitro* fertilization and culture for embryonic development. A morphological assessment of cleaved embryo and the number of embryo that developed to the blastocyst stage was performed on the 3rd and 7rd day of culture respectively. In addition, the quality of obtained blastocysts were assessed by counting the total number of nuclei per blastocyst by cytological analysis. A total of 5 independent experiments were carried out. The number of COCs in each experimental group varied from 165 to 169. There were no significant differences between the 1ph and 2ph groups in terms of the proportion of cleaved oocytes, but the influence of oocyte maturation conditions on their development to the blastocyst stage was found. In the 1ph system, the yield of blastocysts was $11.7 \pm 1.2\%$; when COCs were transferred after 16 hours of maturation to a new medium (2ph system), it increased to $20.2 \pm 2.5\%$ ($P < 0.01$). The use of the two compared IVM protocols did not change the quality of the obtained blastocysts. Concluded that the use of a two-phase system of oocyte IVM which involves the exclusion of gonadotropic hormones from the culture medium in the last 12 hours of IVM increases the resistance of oocytes to age-related transformations and, as a result, their competence for embryonic development after aging *in vitro*.

Keywords: bovine oocytes, *in vitro* maturation, aging, embryo development

Problemy biologii produktivnykh zhivtnykh (Productive Animal Biology). 2022. 4: 79-86

Поступило в редакцию: 20.11.2022

Получено после доработки: 20.12.2022

Сведения об авторах:

Шедова Екатерина Николаевна, н.с., 8(496)765-13-98, +7(916)711-76-73; shedvek@yandex.ru