

## ВОСПРОИЗВОДСТВО

УДК 636.2.082.4:59.089.3:591.3

DOI: 10.25687/1996-6733.prodanimbiol.2023.1.37-43

### ИСПОЛЬЗОВАНИЕ дбцАМФ ДЛЯ КАПАЦИТАЦИИ СПЕРМАТОЗОИДОВ ПРИ ОПЛОДОТВОРНИИ ЯЙЦЕКЛЕТОК КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА *in vitro*

Сметанина И.Г.

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

В момент эякуляции сперматозоиды млекопитающих не обладают способностью пенетрировать созревшие ооциты, а *in vitro* они приобретают оплодотворяющую способность в процессе капацитации, для активации которой в инкубационную среду вводят различные биологически активные добавки. Недостатки этого метода заключаются в трудности подбора этих добавок для моделирования естественных условий капацитации в матке или яйцевоме. Альтернативный подход состоит в создании системы капацитации, в которой вместо биологических добавок используются определённые химически чистые соединения. Цель проведенного исследования – разработка химически “определенной” системы получения созревших *in vitro* ооцитов и криоконсервированных сперматозоидов. В безбелковую среду оплодотворения Тироде в качестве капацитирующего агента вводили дбцАМФ в концентрации 100 мкМ (вместо гепарина в концентрации 10 мкг/мл); при этом среда оплодотворения не содержала глюкозы, или других добавок, активирующих сперматозоиды. Критерием нормального оплодотворения считали развитие эмбрионов до 4-8-клеточной стадии. Полученные результаты показывают, что сперматозоиды, капацитированные в инкубационной среде в присутствии дбцАМФ, могут с высокой эффективностью оплодотворять *in vitro* ооциты крупного рогатого скота, созревшие вне организма в безбелковой среде. Это позволяет создать полностью химически “определённую” систему получения эмбрионов данного вида *in vitro* без добавок, активирующих сперматозоиды, что особенно важно для исследовательских целей по повышению эффективности получения *in vitro* эмбрионов крупного рогатого скота.

*Ключевые слова: крупный рогатый скот, капацитация сперматозоидов, дбц АМФ, оплодотворение in vitro, культуральная среда*

*Проблемы биологии продуктивных животных, 2023, 1: 37-43*

#### Введение

В момент эякуляции сперматозоиды млекопитающих не обладают способностью пенетрировать созревшие ооциты и поэтому они должны приобрести оплодотворяющую способность, которая возникает в матке или яйцевоме в течение нескольких часов (Austin, 1952; Chang, 1951). Этот феномен был назван капацитацией (Austin, 1952). Капацитация включает в себя различные физиологические изменения в сперматозоидах, начинающиеся с удаления поверхностных компонентов или их изменения (Brackett, Oliphant, 1975). В конечном итоге это приводит к гиперактивации и после соответствующих стимулов – к акросомальному экзоцитозу (Yanagimachi, 1994).

В зависимости от вида животного капацитация *in vivo* происходит в матке или яйцевоме (Yanagimachi, 1994). У некоторых видов капацитация может спонтанно происходить при инкубации *in vitro*. Известно, что капацитация может модулироваться белками, присутствующими в жидкостях фолликулов и половых путей (McNutt et al., 1992). Обнаружено также, что

яйцеводная и фолликулярная жидкости могут стимулировать капацитацию спермы крупного рогатого скота *in vitro* (Parrish et al., 1989b; McNutt, Killian, 1991). Гликозаминогликаны, такие как гепарин (или гепарин сульфат) и гиалуроновая кислота (Lee, Ax, 1984), присутствующие в фолликулярной или яйцеводной жидкостях, играют важную роль в капацитации сперматозоидов крупного рогатого скота *in vivo*.

Антикоагулянт гепарин (сульфатированный гликозаминогликан) стимулирует капацитацию посредством связывания и удаления белков семенной плазмы, связанных с мембранами сперматозоидов (Oscarsson et al., 1989; Miller et al., 1990). Установление этих данных привело к тому, что использование гепарина для капацитации сперматозоидов крупного рогатого скота сделало более воспроизводимой методику получения эмбрионов данного вида *in vitro* (Parrish et al., 1988).

Опубликованы данные о том, что дбцАМФ (аналог цАМФ), как компонент “определенной” среды, проникающий в клетку за счёт повышенной растворимости в липидах, может играть позитивную роль в оплодотворении и укорочении времени, требуемого для капацитации сперматозоидов крыс (Toyoda, Chang, 1974) и кроликов (Rosado et al., 1974). Процент оплодотворения яйцеклеток кролика повышался после обработки эякулята семени кролика дбцАМФ (Brackett et al., 1975).

Было показано, что обработка эпидидимальных мышинных сперматозоидов 1 мМ дбцАМФ препятствует оплодотворению яйцеклеток мышей, но в концентрации 0.1 мМ это значительно ускоряет капацитацию, результатом чего явилось раннее и синхронное оплодотворение яйцеклеток, по сравнению с контролем (Fraser, 1981). При использовании дбцАМФ в концентрации 1 и 10 мкМ эффективность оплодотворения ооцитов белых обезьянок повышалась на 50% (Chan et al., 1982). Обработка 8-бромо цАМФ (другой аналог цАМФ) стимулировала *in vitro* акросомную реакцию сперматозоидов человека (DeJonge et al., 1991): обработка одним дбцАМФ или в сочетании с кофеином повышала процент акросомно-прореагировавших сперматозоидов обезьян-макак, по сравнению с контролем или с обработкой одним кофеином (Vanderoort et al., 1994). Позднее было показано, что в содержащей глюкозу безбелковой среде дбцАМФ может инициировать капацитацию криоконсервированных сперматозоидов крупного рогатого скота *in vitro* в отсутствие гепарина и в присутствии дополнительных активирующих реагентов (Dinkins, Brackett, 2000), однако, способность к оплодотворению сперматозоидов, капацитированных с дбцАМФ, и последующее развитие эмбрионов в этой работе не исследовались.

Полученные результаты позволили сделать заключение, что цАМФ является одним из ключевых факторов капацитации сперматозоидов (Harrison, 2003). Это заключение нашло подтверждение в последующих работах, проведенных на сперматозоидах крупного рогатого скота. Так, выброс цАМФ был критическим событием при капацитации сперматозоидов быка *in vitro* (Osuska-Salut et al., 2014). Недавно были опубликованы данные, согласно которым цАМФ, в отличие от его аналогов, не способен проникать в клетки, тем не менее в концентрации 10 нМ он эффективно капацитирует сперматозоиды крупного рогатого скота, придавая им способность оплодотворять ооциты (Alonso et al., 2017). Однако, капацитацию и оплодотворение авторы проводили в средах, содержащих бычий сывороточный альбумин (БСА), а критерием оплодотворения служило только наличие в яйцеклетках двух пронуклеусов после инкубации со сперматозоидами.

Таким образом, установлено, что в процесс капацитации вовлечены многочисленные физиологические события, включая дестабилизацию плазматической мембраны, изменения внутриклеточной концентрации ионов и потенциала мембраны, фосфорилирование белков, однако, молекулярные механизмы этого феномена остаются окончательно не выясненными (Vadnais et al., 2007; Gangavar, Atreja, 2015; Stival et al., 2016).

Вместе с тем, до настоящего времени основным капацитирующим агентом, используемым для оплодотворения ооцитов крупного рогатого скота *in vitro*, является гепарин (Parrish, 2014). Ранее была показана возможность оплодотворения яйцеклеток крупного рогатого скота в

безбелковой среде, в которой в качестве капацитирующего агента также использовали гепарин (Сметанина и др., 2006).

Данное исследование направлено на разработку полностью “определённой” системы получения эмбрионов крупного рогатого скота вне организма из созревших *in vitro* ооцитов и криоконсервированных сперматозоидов. С этой целью вместо гепарина -- сульфатированного гликозаминогликана биологического происхождения, обычно применяемого для капацитации сперматозоидов крупного рогатого скота *in vitro*, в безбелковую среду оплодотворения Тироде, не содержащую глюкозы и каких-либо биологически активных добавок, в качестве капацитирующего агента вводили дбцАМФ.

Цель исследования – изучить оплодотворяющую способность сперматозоидов, капацитированных по этому протоколу, и способность полученных в результате оплодотворения эмбрионов к последующему развитию.

### Материал и методы

Для оценки эффективности способа капацитации сперматозоидов крупного рогатого скота с применением дбцАМФ было проведено две серии экспериментов (по три опыта в каждом) с использованием семени двух быков, так как известно, что чувствительность к капацитирующим агентам у разных быков-производителей может существенно различаться.

Яичники крупного рогатого скота получали на мясокомбинате и транспортировали в лабораторию в течение 2-3 ч при температуре 30<sup>0</sup>С в фосфатно-солевой среде Дюльбекко (ПанЭко, Россия). Ооциты выделяли из антральных фолликулов диаметром 2-6 мм методом рассечения. Для созревания ооцитов использовали среду 199 HEPES (Sigma) с добавлением 5 мкг/мл фолликулостимулирующего гормона (Folltropin, Vetrepharm), 0.3 ед/мл хорионического гонадотропина человека (Ovogest, Intervet), 0.2 мМ пирувата натрия (Sigma), 2 мМ глутамин (Sigma).

Для того, чтобы исключить возможное влияние неопределённых белковых компонентов, в среду созревания не добавляли сыворотку или сывороточный альбумин, как и ранее в наших работах (Сметанина и др., 2000, 2006, 2014, 2017). Ооциты созревали в течение 24 ч в атмосфере 5% CO<sub>2</sub> в воздухе при температуре 38.5<sup>0</sup>С. Для последующего этапа оплодотворения яйцеклеток *in vitro* было использовано три безбелковых среды, в которых БСА был заменен на 0.1 мг/мл ПВА (поливинилалкоголь). Остальные составляющие сред также являлись полностью химически “определёнными”, т.е. не содержали компонентов биологического происхождения.

Среда 1 Тироде использовалась для подготовки спермы (СГ-1, Parrish et al., 1985; Parrish et al., 1988), среда Тироде с буфером Hepes для отмывания ооцитов (Т-Н, Bavister et al., 1983; Parrish et al., 1988), среда Тироде оплодотворения для совместного инкубирования яйцеклеток и сперматозоидов (Т-О, Bavister et al., 1977; Bavister et al., 1983; Parrish et al., 1988). Созревшие *in vitro* ооциты отмывали в среде Т-Н и помещали для совместного инкубирования со сперматозоидами в 500 мкл Т-О, дополненную 10 мкг/мл гепарина, либо 100 мкМ дбцАМФ.

В работе использовали сперму быков Помпей и Вал. Сперму готовили методом swim up (метод всплывания), используя среду СГ-1 с добавлением пирувата натрия до концентрации 1 мМ. Совместную инкубацию яйцеклеток и сперматозоидов осуществляли в течение 18 ч в атмосфере 5% CO<sub>2</sub> в воздухе при температуре 38.5<sup>0</sup>С.

Для оценки способности зигот к дальнейшему развитию, оплодотворённые ооциты трижды отмывали в среде Т-Н, а затем помещали для культивирования в микрокапли синтетической жидкости яйцевода (СЖЯ, Tervit et al., 1972) без глюкозы, содержащей 1 мМ глутамин, 0.33 мМ пирувата натрия и 3 г/л БСА. Культивирование осуществляли в течение 68 ч в атмосфере трёхкомпонентной газовой смеси (5% CO<sub>2</sub>, 5% O<sub>2</sub> и 90% N<sub>2</sub>). В качестве критерия нормального оплодотворения и развития было принято развитие эмбрионов до 4-8 клеточной стадии через 68 ч после начала совместной инкубации ооцитов и сперматозоидов.

## Результаты и обсуждение

Результаты первой серии экспериментов представлены в табл. 1. Показано, что дбцАМФ (опытная группа) капацирует сперматозоиды крупного рогатого скота так же эффективно, как и гепарин (контрольная группа).

Существенных различий между группами по проценту эмбрионов, вступивших в дробление и достигших 4-8-клеточной стадии, не наблюдали, однако, следует отметить, что эмбрионы опытной группы развивались быстрее и выглядели морфологически лучше. Через 68 ч после начала оплодотворения более половины эмбрионов опытной группы, находящихся на стадии 4-8-клеток, достигли 8-клеточной стадии, в то время как в контроле практически все эмбрионы находились на стадии 4-6 клеток

Вторая серия экспериментов показала (табл. 2), что сперма быка Вал более чувствительна к капацирующим свойствам дбцАМФ, чем сперма быка Помпей. В опытной группе процент эмбрионов, начавших дробление и достигших стадии 4-8-клеток, был существенно выше, по сравнению с контролем, однако, по скорости развития такой разницы, как в первой серии экспериментов, не наблюдали, что говорит об индивидуальных особенностях каждого быка производителя.

Таблица 1. Оплодотворение *in vitro* ооцитов крупного рогатого скота после обработки сперматозоидов (бык Помпей) гепарином или дбцАМФ

Капацирующий агент	Число ооцитов, n	Число дробящихся эмбрионов (от 2-х клеток), n (%)	Число эмбрионов на стадии 4-8 клеток (68 ч от начала IVF), n (%)	Число эмбрионов на стадии 8 клеток (68 ч от начала IVF), n (%)
Гепарин (контроль), 10 мкг/мл	78	42 (53,8)	16 (20,5)	1(1,3)*
дбцАМФ, 100 мкМ (опыт)	87	55 (63,2)	19 (21,8)	10 (11,5)*

Примечание: здесь и в табл. 2: \*P<0.01 по *t* - критерию при сравнении с контролем; в скобках приведены данные по трём опытам.

Таблица 2. Оплодотворение *in vitro* ооцитов крупного рогатого скота после обработки сперматозоидов (бык Вал) гепарином или дбцАМФ

Капацирующий агент	Число ооцитов, n	Число дробящихся эмбрионов (от 2-х клеток), n (%)	Число эмбрионов на стадии 4-8 клеток (68 ч после начала IVF), n (%)	Число эмбрионов на стадии 8 клеток (68 ч после начала IVF), n (%)
Гепарин (контроль), 10 мкг/мл	62	32 (51,6)*	13 (20,1)*	2 (3,2)
дбцАМФ, 100 мкМ (опыт)	87	60 (69,0)*	31 (35,6)*	7 (8,0)

В настоящее время основным препаратом, используемым для капациации криоконсервированных сперматозоидов крупного рогатого скота *in vitro*, является гепарин (Parrish, 2014), который получают из слизистой кишечника свиней. Различные препараты гепарина различаются по химическому составу, что влияет на воспроизводимость результатов. При замене гепарина в процессе приготовления спермы на другой химически “определенный” капацирующий агент можно использовать полностью “определённую” среду для получения эмбрионов крупного рогатого скота.

С другой стороны, исследования такого рода приближают к пониманию механизмов феномена капацитации сперматозоидов у разных видов млекопитающих.

Известно, что проникающий в клетки дбцАМФ индуцирует капацитацию криоконсервированных сперматозоидов крупного рогатого скота в безбелковой среде, содержащей глюкозу, без участия гепарина, но способность к оплодотворению капацитированных таким образом сперматозоидов остаётся мало изученной (Dinkins, Brackett, 2000). Элементом новизны является то, что в проведенном исследовании выявлены индивидуальные различия между сперматозоидами от разных быков к воздействию капацитирующих агентов. Аналогичное явление ранее также наблюдалось в наших экспериментах.

Ранее было установлено, что при воздействии цАМФ индуцируется капацитация сперматозоидов и обеспечивается оплодотворение *in vitro* в средах, содержащих белок. При этом оплодотворение оценивалось только по формированию пронуклеусов, а способность оплодотворённых яйцеклеток к дроблению и последующее развитие эмбрионов изучено не было (Alonso et al., 2017).

В данном исследовании впервые показана возможность оплодотворения ооцитов и последующего развития полученных эмбрионов крупного рогатого скота *in vitro* при использовании в качестве капацитирующего агента дбцАМФ в концентрации 100 мкМ без каких-либо активирующих сперматозоиды добавок биологического происхождения. При этом наблюдалось даже некоторое повышение процента оплодотворённых ооцитов и развивающихся эмбрионов, а также повышение скорости развития эмбрионов, по сравнению с общепринятым методом капацитации с использованием гепарина. Это может быть связано с повышением процентной доли капацитированных сперматозоидов или с уменьшением временного интервала, необходимого для процесса капацитации.

### Заклучение

Полученный экспериментальный материал свидетельствует о возможности использования химически чистого соединения дбцАМФ в качестве единственного дополнительного агента в процессе капацитации сперматозоидов крупного рогатого скота *in vitro* в химически “определённой” безбелковой среде, не содержащей глюкозы. Эти данные подтверждают ключевую роль цАМФ в капацитации сперматозоидов крупного рогатого скота, а также позволяют создать полностью “определённую” культуральную систему для получения эмбрионов данного вида вне организма, исключив из неё все биологически активные добавки, что особенно важно для исследовательских целей по повышению эффективности получения *in vitro* эмбрионов крупного рогатого скота.

### Список литературы

1. Сметанина И.Г., Татарина Л.В., Кривохарченко А.С. Влияние состава культуральных сред на созревание ооцитов и развитие эмбрионов крупного рогатого скота *in vitro*. // Онтогенез. 2000. Т. 31. № 2. С. 139-143.
2. Сметанина И.Г., Татарина Л.В., Кривохарченко А.С. Оплодотворение ооцитов крупного рогатого скота *in vitro* в безбелковой культуральной системе. // Онтогенез. 2006. Т. 37. № 6. С. 438–443.
3. Сметанина И.Г., Татарина Л.В., Кривохарченко А.С. Влияние гормонов на созревание ооцитов крупного рогатого скота *in vitro*. // Бюлл. экспер. биологии и медицины. 2014. Т. 157. № 5. С. 655–658.
4. 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.
5. Alonso C.A.J., Osycka-Salut C.E., Castellano L., Cesari A., Di Siervi N., Mutto A., Johannisson A., Morrell J.M., Davio C., Perer-Martinez S. Extracellular cAMP activates molecular signaling pathways associated with sperm capacitation in bovines. // Mol. Hum. Reprod. 2017. Vol. 23. P. 1-14.
6. Austin C.R. The capacitation of the mammalian sperm. // Nature. 1952. Vol. 170. P. 326.
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. Vol. 28. P. 235-247.

8. 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.
9. Brackett B.G., Jeitles G.G., Oh Y.K. Fertilisation by sperm treated with high ionic strength and N<sup>6</sup>,O<sup>2</sup>-dibutyryl adenosine 3':5'-cyclic monophosphoric acid. // *Fed. Proc.* 1975. Vol. 34. P. 456.
10. Brackett B.G., Oliphant G. Capacitation of rabbit spermatozoa in vitro // *Biol. Reprod.* 1975. Vol. 12. P. 260-74.
11. Chan P.J., Hutz R.J., Dukelow W.R. Nonhuman primate in vitro fertilization: seasonality, cumulus cells, cyclic nucleotides, ribonucleic acid, and viability assays. // *Fertil. Steril.* 1982. Vol. 38. P. 609-615.
12. Chang M.C. Fertilizing capacity of spermatozoa deposited into the fallopian tubes. // *Nature.* 1951. Vol. 168. P. 697-698.
13. Dinkins M.B., Brackett B.G. Chlortetracycline staining patterns of frozen-thawed bull spermatozoa treated with  $\beta$ -cyclodextrins, dibutyryl cAMP and progesterone. // *Zygote.* 2000. Vol. 8. P. 245-256.
14. Fraser L.R. Dibutyryl cyclic AMP decreases capacitation time in vitro in mouse spermatozoa. // *J. Reprod. Fert.* 1981. Vol. 62. P. 63-72.
15. Gangwar D. K., Atreja S.K. Signalling events and associated pathways related to the mammalian sperm capacitation. // *Reprod. Dom. Anim.* 2015. Vol. 50. P. 705-711.
16. Harrison R.A.P. Cyclic AMP signaling during mammalian sperm capacitation – still largely terra incognita. // *Reprod. Dom. Anim.* 2003. Vol. 38. P. 102-110.
17. De Jonge C.J., Han H.L., Lawrie H., Mack S.R., Zaneveld L.J. Modulation of the human sperm acrosome reaction by effectors of the adenylate cyclase/cyclic AMP second-messenger pathway. // *J. Exp. Zool.* 1991. Vol. 258. P. 113-125.
18. Lee C.N., Ax R.L. Concentrations and composition of glycosaminoglycans in the bovine reproductive tract. // *J. Dairy Sci.* 1984. Vol. 67. P. 2006-2009.
19. Miller D.J., Winer M.A., Ax R.L. Heparin-binding proteins from seminal plasma bind to bovine spermatozoa and modulate capacitation by heparin. // *Biol. Reprod.* 1990. Vol. 42. P. 899-915.
20. McNutt T., Killian G. Influence of bovine follicular and oviduct fluids on sperm capacitation in vitro. // *J. Androl.* 1991. Vol. 12. P. 244-252.
21. McNutt T., Rogowski L., Vasilatos-Younken R., Killian G. Adsorption of oviductal fluid proteins by the bovine sperm membrane during in vitro capacitation. // *Mol. Reprod. Dev.* 1992. Vol. 33. P. 313-323.
22. Oscarsson L.G., Pejler G., Lindahl U. Location of the antithrombin-binding sequence in heparin chain. // *J. Biol. Chem.* 1989. Vol. 264. P. 296-304.
23. Osycka-Salut C., Diez F., Burdet J., Gervasi M.G., Franchi A., Bianciotti L.G., Davio C., Perez-Martinez S. Cyclic AMP efflux, via MRPs and A1 adenosine receptors, is critical for bovine sperm capacitation. // *Mol. Hum. Reprod.* 2014. Vol. 20. P. 89-99.
24. 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.
25. Parrish J.J., Susko-Parrish J.L., Winer M.A., First N.L. Capacitation of bovine sperm by heparin. // *Biol. Reprod.* 1988. Vol. 38. 8P. 1171-80.
26. Parrish J.J., Susko-Parrish J.L., Handrow R., Sims M., First N.L. Capacitation of bovine spermatozoa by oviduct fluid. // *Biol. Reprod.* 1989b. Vol. 40. P. 1020-1025.
27. Parrish J. J. Bovine in vitro fertilization: In vitro oocyte maturation and sperm capacitation with heparin. // *Theriogenology.* 2014. Vol. 81. P. 1-12.
28. Rosado A., Hicks J. J., Reyes A., Blanco I. Capacitation in vitro of rabbit spermatozoa with cyclic adenosine monophosphate and human follicular fluid. // *Fert. Steril.* 1974. Vol. 25. P. 821-824.
29. Stival C., Puga Molina Ldel C., Paudel B., Buffone M.G., Visconti P.E., Krapf D. Sperm capacitation and acrosome reaction in mammalian sperm. // *Adv. Anat. Embryol. Cell. Biol.* 2016. Vol. 220. P. 93-106.
30. 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.
31. Toyoda Y., Chang M.C. Capacitation of epididymal spermatozoa with high K/Na ratio and cyclic AMP for the fertilization of rat eggs in vitro. // *J. Reprod. Fert.* 1974. Vol. 36. P. 125-134.
32. Vadnais M.L., Galantino-Homer H.L., Althouse G.C. Current concepts of molecular events during bovine and porcine spermatozoa capacitation. // *Arch. Androl. J. Reprod. Syst.* 2007. Vol. 53. P. 109-123.
33. VandeVoort C.A., Tollner T.L., Overstreet J.W. Separate effects of caffeine and dbcAMP on macaque sperm motility and interaction with the zona pellucida. // *Mol. Reprod. Dev.* 1994. Vol. 37. P. 299-304.
34. Yanagimachi R. Mammalian fertilization. // *The Physiology of Reproduction* (E. Knobil and J.D. Neill, eds). New York: Raven Press, 1994. P. 189-317.

### References (for publications in Russian)

1. Smetanina I.G., Tatarinova L.V., Krivokharchenko A.S. [Effect of the composition of cultural media on the maturation of oocytes and the development of embryos of cattle *in vitro*]. *Ontogenez* (Ontogenesis). 2000. 31(2): 139-143.
2. Smetanina I.G., Tatarinova L.V., Krivokharchenko A.S. [Fertilization of bovine oocytes *in vitro* in a protein-free culture system]. *Ontogenez* (Ontogenesis). 2006. 37(6): 438-443.
3. Smetanina I.G., Tatarinova L.V., Krivokharchenko A.S. [Effect of hormones on the maturation of bovine oocytes *in vitro*]. *Byulleten' eksperimental'noi biologii i meditsiny* (Bulletin of Experimental Biology and Medicine). 2014. 157(5): 655-658.
4. Smetanina I.G., Tatarinova L.V., Krivokharchenko A.S. [Effect of hypoxanthine at low concentrations on the maturation and fertilization of bovine oocytes *in vitro*]. *Izvestiya RAN. Seriya biologicheskaya* (News RAS. Biological series). 2017. 5: 1-4.

UDC: 636.2.082.4:59.089.3:591.3

### The use of dbcAMP for capacitation of sperms during fertilization of bovine eggs *in vitro*

Smetanina I.G.

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

**ABSTRACT.** At the moment of ejaculation, mammalian spermatozoa do not have the ability to penetrate mature oocytes, and *in vitro* they acquire fertilizing ability in the process of capacitation, to activate which various biologically active additives are introduced into the incubation medium. The disadvantages of this method are the difficulty in selecting these additives to simulate the natural conditions of capacitation in the uterus or oviduct. An alternative approach is to create a capacitation system that uses certain chemically pure compounds instead of biological additives. The aim of the study was to develop a chemically defined system for obtaining *in vitro* matured oocytes and cryopreserved spermatozoa. As a capacitating agent, dbcAMP was introduced into a protein-free Tyrode fertilization medium at a concentration of 100  $\mu\text{M}$  (instead of heparin at a concentration 10  $\mu\text{g/ml}$ ); while the fertilization medium did not contain glucose, as well as any additives that activate spermatozoa. The development of embryos up to the 4-8-cell stage was considered as the criterion for normal fertilization. The results obtained show that spermatozoa capacitated in an incubation medium in the presence of dbcAMP can fertilize *in vitro* bovine oocytes matured outside the body in a protein-free medium with high efficiency. This makes it possible to create a completely chemically “defined” system for obtaining embryos of this species *in vitro* without additives activating spermatozoa, which is especially important for research purposes to increase the efficiency of obtaining bovine embryos *in vitro*.

*Keywords: cattle, spermatozoa capacitation, dbc AMP, defined cultural medium, in vitro fertilization*

*Problemy biologii produktivnykh zhivotnykh* (Productive Animal Biology), 2023, 1: 37-43

Поступило в редакцию: 25.12.2022

Получено после доработки: 10.01.2023

Сведения об авторах:

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