



# **ВОЗДЕЙСТВИЕ ГИПОКСАНТИНА В НИЗКИХ КОНЦЕНТРАЦИЯХ НА СОЗРЕВАНИЕ И ОПЛОДОТВОРЕНИЕ ООЦИТОВ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА IN VITRO**

**Докладчик – Сметанина Ирина Геннадьевна к.б.н., с.н.с.  
ВНИИФБиП – филиал ВИЖ им. Л.К.Эрнста**

**Ставрополь -2022**

# ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследование действия различных специфических молекул, которые могут участвовать в механизмах регуляции мейоза, представляет большой практический и теоретический интерес. Одним из таких веществ является гипоксантин (Гк) - компонент фолликулярной жидкости. Показано, что Гк поддерживает целостность фолликулярной базовой мембраны. Гк в концентрации 4mM положительно влияет на морфологию культивируемых ооцитов крупного рогатого скота (КРС) и сохраняет их при этом на стадии зародышевого пузырька, но ингибирование ядерного созревания обратимо. Интересно, что концентрации Гк в фолликулярной жидкости коз снижается в процессе развития фолликула с 1.16 мМ в фолликулах диаметром до 0.5 мм до 0.45 мМ в фолликулах диаметром от 5 мм. Гк обратимо блокирует мейоз, после чего ооциты коз были способны к нормальному ядерному созреванию и активации.

Ранее нами показано, что состав среды культивирования может влиять на созревание ооцитов КРС *in vitro*. Все исследованные нами среды (DMEM, TCM-199, Ham'F-10, Ham'F-12) отличались друг от друга по содержанию Гк - промежуточного продукта катаболизма пуриновых оснований. Причем, чем ниже была концентрация Гк в среде, тем больший процент ооцитов возобновлял мейоз и достигал стадии метафаза 2 (M2). Полученные нами результаты указывали на возможный ингибирующий эффект Гк.

Целью настоящей работы являлось прямое изучение влияния низких концентраций Гк на созревание и последующее оплодотворение яйцеклеток КРС *in vitro*. Для этого мы в своих экспериментах в не содержащую Гк безбелковую культуральную среду MEM-alfa вводили экзогенный Гк в концентрации 0.06 мМ.

Это заметно выше, чем в изученных нами ранее средах, однако, на два порядка меньше, чем в опубликованных ранее работах по исследованию влияния Гк на ооциты млекопитающих *in vitro*.

# МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для созревания ооцитов, как и в предыдущих наших работах использовали безбелковую среду MEM-alfa ("Sigma") с добавлением 2 мМ глутамин ("Serva", Германия), 1 мкг/мл фолликулостимулирующего гормона ("ФСГ-супер", ООО "Агробиомед"). Ооциты опытной группы культивировали с добавлением Гк ("ICN") в концентрации 8 мкг/мл (0.06 мМ). Ооциты культивировали в 4-х луночных чашках фирмы "Nunc" (Дания), по 50 ооцит-кумуляусных комплексов на лунку с 500 мкл среды в течение 24 ч.

Созревшие *in vitro* ооциты помещали для совместного инкубирования со сперматозоидами в 500 мкл среды оплодотворения (из расчета 10 ооцитов на 50 мкл среды) Тироде с 25 мМ бикарбоната натрия, дополненную 10 мкг/мл гепарина ("Fluka") и 6 г/л БСА ("Sigma"). Сперму готовили методом "всплывания" ("swim-up"). Концентрация сперматозоидов в среде оплодотворения составляла 3 млн/мл. Сперматозоиды и яйцеклетки совместно инкубировали в течение 18 часов.

Во все используемые среды добавляли гентамицин (ОАО "Биохимик") в концентрации 40 мкг/мл.

# РЕЗУЛЬТАТЫ

**Таблица 1. Влияние Гк на достижение ооцитами КРС in vitro стадии М2**

<b>Количество ооцитов, п</b>	<b>Контроль (ФСГ - 24 часа)</b>	<b>Опыт (ФСГ+ гипоксантин, 24 часа)</b>
<b>Идентифицировано на тотальных препаратах</b>	<b>87</b>	<b>120</b>
<b>Достигло стадии М2</b>	<b>60(69%) а</b>	<b>39(32.5%) в</b>

**Примечание. Приведена сумма результатов от трех опытов.  
а,в -  $p < 0.001$ .**

**Таблица 2. Влияние Гк на оплодотворение ооцитов КРС in vitro**

<b>Количество ооцитов, n</b>	<b>Контроль(ФСГ - 24 часа)</b>	<b>Опыт (ФСГ + гипоксантин, 24 часа)</b>
<b>Идентифицировано на тотальных препаратах</b>	<b>60</b>	<b>88</b>
<b>Пенетрировано</b>	<b>38(63.3%) а</b>	<b>38(43.2%) в</b>
<b>Нормально оплодотворено</b>	<b>26(43.3%) а</b>	<b>21(23.9%) в</b>

**Примечание. Приведена сумма результатов от двух опытов. а,в  
- P < 0,05.**

**Из данных таблиц видно, что введение в среду созревания ооцитов КРС даже небольшой дозы Гк (0.06 мМ), достоверно уменьшает процент ооцитов, достигших стадии М2, а в дальнейшем и процент пенетрированных и нормально оплодотворенных ооцитов. В нормально оплодотворенных яйцеклетках на препаратах визуализировались два пронуклеуса (мужской и женский). К пенетрированным яйцеклеткам, помимо нормально оплодотворенных относили также ооциты с тремя и более пронуклеусами, а также ооциты с деконденсированными головками сперматозоидов.**

# **ЗАКЛЮЧЕНИЕ**

**Результаты данной работы прямо демонстрируют ингибирующий эффект низких концентраций Гк. Введение в безбелковую среду созревания даже небольшой дозы Гк 0.06мМ (что на два порядка меньше, чем в ранее опубликованных работах), достоверно уменьшает процент ооцитов КРС, возобновивших мейоз, а в дальнейшем и процент пенетрированных и нормально оплодотворенных ооцитов.**

**СПАСИБО ЗА ВНИМАНИЕ!**

