



ПРИМЕНЕНИЕ ДИБУТИРИЛЦИКЛИЧЕСКОГО АДЕНОЗИНМОНОФОСФАТА ДЛЯ КАПАЦИТАЦИИ СПЕРМАТОЗОИДОВ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА *IN VITRO*

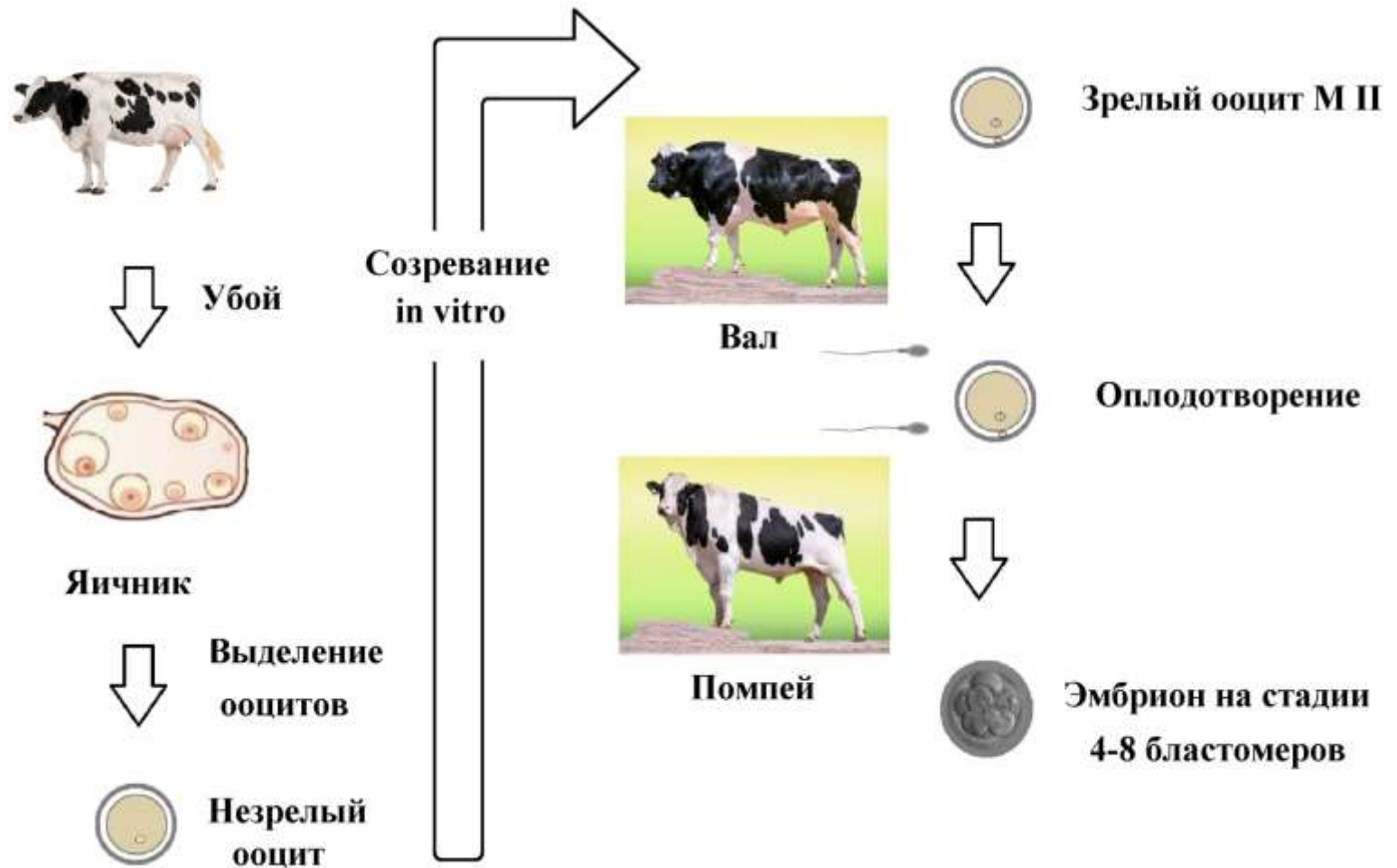
**Докладчик – Сметанина Ирина Геннадьевна к.б.н., с.н.с.
ВНИИФБиП – филиал ВИЖ им. Л.К.Эрнста**

Красноярск - 2022

ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Данная работа направлена на разработку полностью химически “определенной” системы получения эмбрионов крупного рогатого скота вне организма из созревших *in vitro* ооцитов и криоконсервированных сперматозоидов. С этой целью вместо сульфатированного гликозаминогликана гепарина биологического происхождения, обычно применяемого для капацитации сперматозоидов крупного рогатого скота *in vitro*, в не содержащую глюкозы и каких-либо добавок, активирующих сперму, химически “определенную” безбелковую среду оплодотворения Тироде вводили химически “определенный” капацитирующий агент –дбцАМФ. При этом впервые ставилась задача изучить оплодотворяющую способность капацитированных таким образом сперматозоидов, а также способность полученных в результате оплодотворения эмбрионов к последующему развитию.

СХЕМА ЭКСПЕРИМЕНТА



МАТЕРИАЛЫ 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°C 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 mM пирувата натрия (Sigma), 2 mM глутамина (Sigma). Для того, чтобы исключить возможное влияние неопределенных белковых компонентов, мы не добавляли сыворотку или сывороточный альбумин к среде созревания, как и ранее в наших работах (Сметанина и др., 2000, 2006, 2014, 2017).

Ооциты созревали в течение 24 часов в атмосфере 5%-ного CO_2 в воздухе при температуре 38.5°C . Для последующего этапа оплодотворения яйцеклеток *in vitro* было использовано три безбелковых среды, где БСА был заменен на 0.1 мг/мл ПВА (поливинилалкоголя). Остальные составляющие сред также являлись полностью химически “определенными”, то есть не содержали компонентов биологического происхождения. Это среда 1 Тироде 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” (“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%-ного CO₂ в воздухе при температуре 38.5°C. Для оценки способности зигот к дальнейшему развитию оплодотворенные 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 глутамина, 0.33 мМ пирувата натрия и 3 г/л БСА. Культивирование осуществляли в течение 68 ч в атмосфере трехкомпонентной газовой смеси (5% CO₂, 5% O₂ и 90% N₂). Развитие эмбрионов до 4-8 клеточной стадии через 68 ч после начала совместной инкубации ооцитов и сперматозоидов было взято как критерий нормального оплодотворения.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Таблица 1. In vitro оплодотворение ооцитов крупного рогатого скота после обработки сперматозоидов (бык “Помпей”) гепарином или дбцАМФ

Капацитирующий 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 (%)
10 мкг/мл гепарина (контроль)	78	42 (53,8)	16 (20,5)	1(1,3)*
100 мкМ дбцАМФ (опыт)	87	55 (63,2)	19 (21,8)	10 (11,5)*

***P<0.01; в скобках приведены данные трех опытов.**



Данные первой серии экспериментов представлены в таблице 1. Показано, что дбцАМФ (опытная группа) капацитирует сперматозоиды крупного рогатого скота также эффективно, как и гепарин (контрольная группа). Достоверных 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 достоверно 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.

Таблица 2. In vitro оплодотворение ооцитов крупного рогатого скота после обработки сперматозоидов (бык “Вал”) гепарином или дбцАМФ

Капацитирующий 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 (%)
10 мкг/мл гепарина (контроль)	62	32 (51,6)*	13 (20,1)*	2 (3,2)
100 мкМ дбцАМФ (опыт)	87	60 (69,0)*	31 (35,6)*	7 (8,0)

***P<0.05; в скобках приведены данные трех опытов.**



Вторая серия экспериментов показала (табл. 2), что сперма быка “Вал” более чувствительна к капацитирующим свойствам дбцАМФ, чем сперма быка “Помпей”. В опытной группе процент эмбрионов, начавших дробление и достигших стадии 4-8-клеток, был достоверно 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.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, полученный экспериментальный материал демонстрирует возможность использования только дбцАМФ в качестве химически “определенного” капацитирующего агента сперматозоидов крупного рогатого скота *in vitro* вместо сульфатированного гликозоаминогликана гепарина биологического происхождения в не содержащей глюкозы химически “определенной” безбелковой среде Тироде.

Наши данные подтверждают ключевую роль цАМФ в капацитации сперматозоидов крупного рогатого скота *in vitro*, а также позволяют создать полностью “определенную” культуральную систему для получения эмбрионов данного вида вне организма, исключив из нее все биологические составляющие.

СПАСИБО ЗА ВНИМАНИЕ!

