УДК 636.2: 612.621

МОДЕРНИЗАЦИЯ ЭТАПОВ ТЕХНОЛОГИИ ЭКСТРАКОРПОРАЛЬНОГО СОЗРЕВАНИЯ ДОНОРСКИХ ООЦИТОВ *BOS TAURUS*

КУЗЬМИНА Татьяна Ивановна, *Всероссийский научно-исследовательский институт генетики и разведения сельскохозяйственных животных*

МОЛЧАНОВ Алексей Вячеславович, *Саратовский государственный аграрный университет имени Н.И. Вавилова*

ТАТАРСКАЯ Диана Николаевна, *Международный Центр Репродуктивной Медицины*

СТАНИСЛАВОВИЧ Татьяна Ивановна, *Всероссийский научно-исследовательский институт генетики и разведения сельскохозяйственных животных*

Базовый метод инновационных клеточных репродуктивных технологий (получение эмбрионов in vitro, клонирование, трансгенез) – экстракорпоральное созревание донорских ооцитов. Оценка качества ооцитов и совершенствование сред для созревания являются одними из важнейших задач эмбриотехнологов. В данном исследовании на основе сравнительного комплексного анализа морфологии кумулюса и хроматина ооцитов (стадии мейоза и деструктивные изменения) проанализированы потенции к созреванию ооцитов в зависимости от их функционального статуса (растущие или завершившие фазу роста). BCB-диагностику, основанную на различии в окраске ооплазмы после воздействия витального красителя бриллиантового кристаллического голубого, использовали для определения функционального статуса ооцитов. Прослежена динамика преобразования хроматина при мейотическом созревании ооцитов контрольной группы и ооцитов в различном функциональном состоянии. Полученные данные свидетельствуют о возможности ооцитов, не завершивших фазу роста in vivo, при пролонгировании времени культивирования завершить ядерное созревание in vitro. В исследуемых группах не обнаружено достоверных различий в доле дегенерированных ооцитов в процессе культивирования вплоть до 30 ч. Предложена система для созревания in vitro ооцитов коров, предварительно тестированных на основе BCB-диагностики как не завершивших фазу роста in vivo, позволяющая увеличивать выход эмбрионов при оплодотворении in vitro до 38 %. Эффект достигается введением в среду дозревания 50 нг/мл пролактина, сменой среды через 15 ч от начала культивирования с добавлением 10 МЕ/мл хорионического гонадотропина человека и увеличением времени инкубирования до 30 ч.

Клеточные репродуктивные технологии, основанные на достижениях фундаментальных исследований в области биологии развития, в настоящее время активно внедряются в практику животноводства. Интенсификация внедрения эмбриотехнологий, в том числе трансплантации эмбрионов, клонирования, трансгенеза с сочетанием методов молекулярной генетики, позволяет значительно повышать эффективность селекции высокопродуктивных животных, получать особей, резистентных к различным заболеваниям, способных продуцировать многие биологически активные вещества, используемые в фармакологии, получать линии эмбриональных стволовых клеток. Базовым методом вышеуказанных технологий является экстракорпоральное созревание донорских ооцитов [8].

В настоящее время получение эмбрионов из ооцитов, выделенных из постмортальных яичников или из организма животного in vivo трансвагинальной аспирацией, используется в программах разведения крупного рогатого скота при моделировании стад и является важным инструментом для коммерциализации достижений вспомогательных репродуктивных технологий. Несмотря на то, что начало разработки основных этапов технологии экстракорпорального созревания и оплодотворения ооцитов коров датируется 1980-ми годами прошлого столетия, выход эмбрионов на завершающей стадии до имплантационного развития кардинально не изменился, в лучших случаях составил от 30 до 40 % [2]. Следует также отметить нестабильность получаемых результатов, которая зависит от множества причин, одна из самых главных – качество донорских ооцитов.

В последние годы внимание эмбриотехнологов акцентировано на поиске подходов, гарантирующих унификацию имеющихся

систем дозревания, и объективной оценке компетентности женской гаметы к созреванию in vitro. В этой связи BCB-тест, основанный на различиях в ответной реакции растущих или завершивших фазу роста ооцитах, обработанных витальным красителем бриллиантовым кристаллическим голубым, позволяет более информативно оценить функциональное состояние ооцитов, выделенных из яичников. Многочисленные исследования показывают низкие потенции ооцитов, не завершивших фазу роста in vivo, к развитию из них эмбрионов на стадии бластоцисты [1, 3, 7, 11] и, наоборот, ооциты, которые завершили фазу роста, успешно оплодотворяются и зародыши достигают стадии бластоцисты.

Резонно предположить, что одной из причин низкой результативности получения эмбрионов является разнородность популяции донорских ооцитов, выделяемых из фолликулов. В наших ранних исследованиях показано, что в фолликулах, из которых выделяют ооциты для последующего созревания и оплодотворения, находится от 21 до 30 % ооцитов, по морфологическим признакам оцененных как пригодные для культивирования (ооциты с гомогенной ооплазмой, равномерной по ширине зоной пеллюцида, окруженные не менее, чем 5–6-ю слоями кумулюсных клеток), а при BCB-тестировании оцененные как растущие [12].

В связи с вышеизложенным цель настоящего исследования – модернизация систем дозревания in vitro ооцитов коров, позволяющая «доращивать» ооциты, извлеченные из постмортальных яичников на стадии роста, для увеличения выхода эмбрионов из них при экстракорпоральном оплодотворении.

Методика исследований. В экспериментах использовали постмортальные яичники коров разного возраста, нетелей. Яичники, полученные на мясокомбинате, доставляли в лабораторию в термосе в стерильном физиологическом растворе при температуре 32...35 °С. Для исследований отбирали яичники без видимых признаков патологии и промывали их в теплом физиологическом растворе (37 °С) с антибиотиками (50 мкг/мл стрептомицина и 100 ед./мл пенициллина).

Ооцит-кумулюсные комплексы выделяли путем аспирации содержимого фолликулов диаметром 3–6 мм и помещали в чашки Петри средой ТС-199 с 5 % фетальной сыворотки крупного рогатого скота. Для экспериментов отбирали ооциты округлой формы, с гомогенной ооплазмой, равномерной по ширине зоной пеллюцида, окруженные многослойным компактным кумулюсом. Все манипуляции с ооцит-кумулюсными комплексами и их морфологическую оценку выполняли под стереомикроскопом в асептических условиях при температуре 37 °С.

Морфологически оцененные ооциты подвергали BCB-тесту. Для этого ооцит-кумулюсные комплексы коров отмывали в растворе Дюльбекко с 0,4 % бычьего сывороточного альбумина. Затем 90 мин экспонировали в растворе 26 мкМ BCB (бриллиантовый кристаллический голубой – brilliant cresyl blue (B-5388, Sigma) в Дюльбекко. Ооцит-кумулюсные комплексы отмывали в растворе Дюльбекко трижды и разделяли на ооциты с синей окраской ооплазмы – завершившие фазу роста [BCB(+)] и неокрашенные – растущие [BCB(–)]. Ооцит-кумулюсные комплексы культивировали группами по 15–20 шт. в каплях среды объемом 200 мкл совместно с клетками гранулезы (1 млн клеток на 1 мл среды), покрытых минеральным маслом, в течение 30 ч при температуре 38,5 °С в атмосфере с 5 % CO_2 и 90%-й влажностью. Для культивирования использовали среду ТС-199 (с L-глутамином), содержащую 20 % фетальной сыворотки крупного рогатого скота, 50 нг/мл бычьего пролактина (Эндокринологический центр РАМН, Москва), 0,55 мг/мл лактата кальция, 0,23 мг/мл пирувата натрия, 1,27 мг/мл Hepes и 50 мкг/мл гентамицина.

Ооцит-кумулюсные комплексы культивировали в течение 15 ч при температуре 38,5 °С в увлажненном воздухе, содержащем 5 % CO_2, затем дополняли среду 10 МЕ/мл хорионического гонадотропина человека и культивировали еще 15 ч. Оплодотворение ооцитов выполняли в соответствии с методом, описанным ранее [7]. Оплодотворенные клетки через 24 ч отмывали дважды в PBS и один раз в среде mSOF [6], затем встряхивали на вортексе при 2500 об/мин в течение 1 мин и отмывали в среде mSOF перед переносом в капли объемом 25 мкл mSOF + 20 г/л BSA.

Культивирование эмбрионов проводили под минеральным маслом в атмосфере 5 % углекислого газа, 5 % кислорода и 90 % азота. Через 48 ч после осеменения подсчитывали число раздробившихся яйцеклеток и оцени-

вали качество эмбрионов по общепринятым критериям. На 5-й и 8-й день после оплодотворения оценивали соответственно выход морул и бластоцист. Для цитогенетического исследования ядерного материала клеток готовили препараты хромосом по методу A.K. Tarkowski [10]. Все использованные реагенты закуплены в Sigma-Aldridge, Москва.

Для сравнения результатов, полученных в опытных и контрольных группах, использовали критерии $\chi 2$. Данные обрабатывали с помощью статистической программы Sigma Stat. Достоверность различия сравниваемых средних значений оценивали при трех уровнях значимости: $P < 0{,}05$; $P < 0{,}01$; $P < 0{,}001$.

Результаты исследований. Качество сформировавшейся яйцеклетки определяет успешное развитие из нее эмбриона. Возможность оказывать влияние ооцита на дифференцировку соматических клеток фолликула была показана в работе [5]. Взаимодействие между ооцитом и окружающими его соматическими клетками овариального фолликула необходимо для нормального функционирования как гаметы, так и других фолликулярных клеток [4, 9].

Важным показателем успешного культивирования является степень экспансии (разрыхления) клеток кумулюса при созревании ооцита. В наших исследованиях показано, что через 24 ч культивирования 93 % ВСВ (+) ооцитов в контроле были окружены кумулюсом с высокой степенью экспансии, в контроле и группе ВСВ (–) ооцитов этот показатель составил соответственно 78 и 52 % (рис. 1).

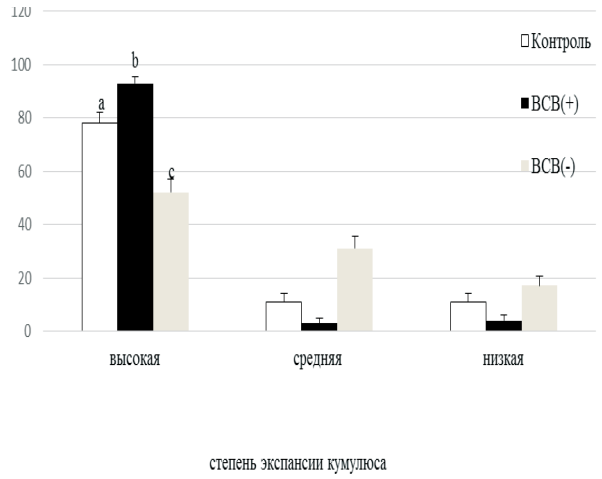

Рис. 1. Морфология кумулюса ВСВ (+) и ВСВ (–) ооцитов коров после 24 ч культивирования (число ооцитов – 300; 3 повторности, ОКК – ооцит-кумулюсные комплексы), $^{a:c, b:c}$ P <0,05 (критерий χ-квадрат)

В экспериментах в сравнительном аспекте прослеживали динамику преобразования хроматина при мейотическом созревании ооцитов контрольной группы (без ВСВ-диагностики) и ооцитов в различном функциональном состоянии (завершившие фазу роста и растущие). Результаты оценки показателей ядерного созревания представлены на рис. 2.

Через 6 ч культивирования основная часть ооцитов во всех исследуемых группах находилась на стадии диплотены. После 12 ч культивирования лишь 50 % ВСВ (–) ооцитов продвинулись в своем развитии, в то время как 98 % ВСВ (+) ооцитов и 94 % ооцитов в контрольной группе реинициировали мейоз. Через 18 ч экспозиции на завершающих этапах мейотического созревания находилось 59 % ооцитов контрольной группы, 72 % ВСВ (+) ооцитов и 38 % ВСВ (–) ооцитов. Основная масса ВСВ (+) ооцитов (81 %) и ооцитов контрольной группы (70 %) достигла стадии метафазы-II через 24 ч и лишь 52 % ВСВ (–) ооцитов завершили ядерное созревание. После 30 ч экспозиции на стадии метафазы II находился уже 71% ВСВ (–) ооцитов, не изменился процент выхода зрелых яйцеклеток в контрольной группе и в группе, где культивировали ВСВ (+) ооциты.

Полученные данные свидетельствуют о возможности ооцитов, не завершивших фазу роста in vivo, при пролонгировании времени культивирования завершить ядерное созревание in vitro. При анализе деструктивных изменений хроматина в ооцитах (время

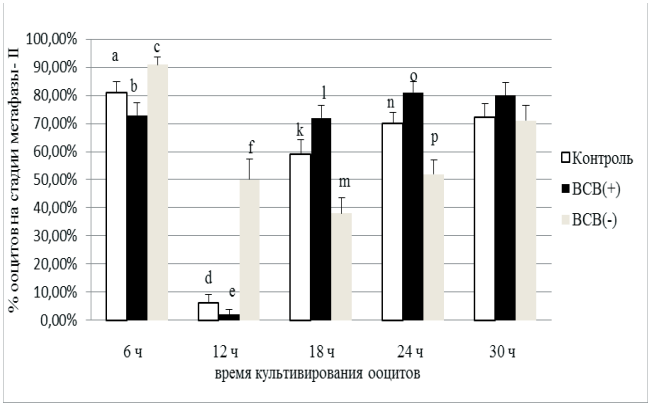

Рис. 2. Ядерное созревание ВСВ (+) и ВСВ (–) ооцитов коров (n ооцитов – 1291; число повторностей – 4). $^{b:c}$ P<0,05; $^{d:e}$ P<0,05; $^{e:f}$ P<0,05; $^{d:f}$ P<0,05; $^{k:m}$ P<0,05; $^{l:m}$ P<0,05; $^{n:p}$ P<0,05; $^{o:p}$ P<0,05 (критерий χ-квадрат).

культивирования пролонгировали до 30 ч) были получены результаты, представленные на рис. 3.

Во всех исследованных группах отмечена тенденция к возрастанию количества ооцитов с дегенерацией хромосом (контроль от 19 до 31 %, группа ВСВ (+) – от 12 до 24 %) по мере культивирования, наименее выраженная в группе ВСВ (–) ооцитов (от 16 до 22 %). В исследуемых группах не обнаружено достоверных различий в проценте дегенерированных ооцитов в процессе культивирования вплоть до 30 ч. Основываясь на анализе результатов, приведенных выше, нами были проведены эксперименты по оплодотворению ВСВ (–) ооцитов, прокультивированных в течение 30 ч со сменой среды культивирования через 15 ч путем добавления в базовую среду 10 МЕ/мл хорионического гонадотропина человека. Проведенная модификация позволила увеличить выход эмбрионов из ооцитов, завершивших фазу роста in vitro, до 38 %, что оказалось на 18 % выше, чем в группе ВСВ (–) ооцитов, прокультивированных в течение 24 ч без смены среды, дополненной хорионическим гонадотропином человека (рис. 4).

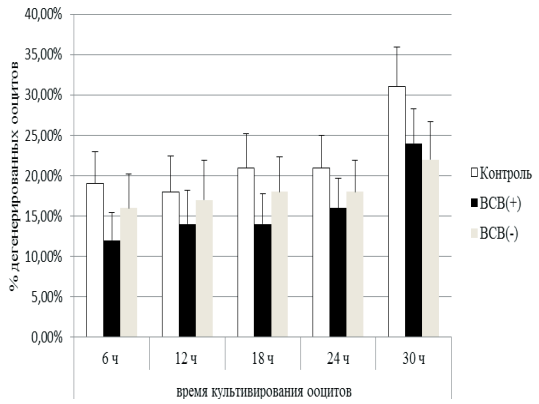

Рис. 3. Характеристика состояния хроматина в ВСВ (+) и ВСВ (–) ооцитах коров на разных этапах культивирования (n ооцитов – 1279; число повторностей – от 3 до 5)

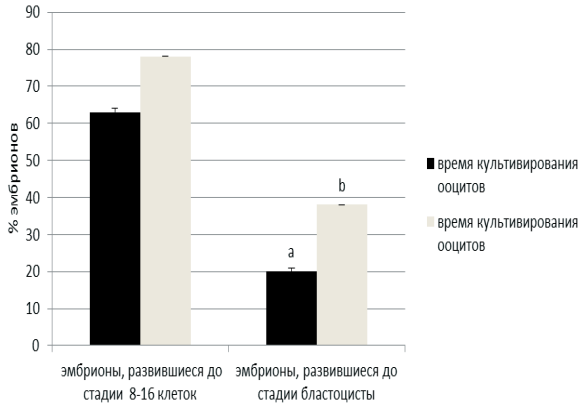

Рис. 4. Развитие доимплантационных эмбрионов коров, полученных из ооцитов, не завершивших фазу роста in vivo, созревших при пролонгации культивирования до 30 ч (n ооцитов – 290, n эмбрионов – 205). [a: b] ***P<0,05 (критерий χ-квадрат)***

Выводы. Предметом дальнейшего изучения возможности использования в технологии экстракорпорального созревания ооцитов, не завершивших фазу роста invivo, представляется оценка качества полученных из них эмбрионов с учетом морфологии, апоптозных изменений и, разумеется, оценкой их приживляемости при трансплантации.

Предложенная система для созревания in vitro ооцитов коров, основанная на превентивной диагностике функционального состояния ооцитов донорской популяции с использованием ВСВ-теста, позволит получать большее количество ооцитов, компетентных к дальнейшему оплодотворению для получения эмбрионов или для реконструкции ооцита в целях клеточной (клонирование) и генетической (трансгенез) инженерии.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Alm H., Torner H., Lohrke B.* et al. Bovine blastocyst development rate in vitro is influenced by selection of oocytes by brillantcresyl blue staining before IVM as indicator for glucose-6-phosphate dehydrogenase activity // Theriogenology, 2005, Vol. 63, P. 2194–2205.

2. *Andrew W, Taylor-Robinsonand and Van Huong Do.* Recent developments in in vitro fertilization technologies in livestock // Avid Science, 2016, Vol. 1, P. 3– 30.

3. *Bhojwani S., Alm H., Torner H., Kanitz W., Poehland R.* Selection of developmentally competent oocytes through brilliant cresyl blue stain enhances blastocyst development rate after bovine nuclear transfer // Theriogenology, 2007, Vol. 67, P. 341.

4. *CoticchioG., CantoM. D., Renzini M. M.* et al. Oocyte maturation: gamete-somatic cells interactions, meiotic resumption, cytoskeletal dynamics and cytoplasmic reorganization // Hum Reprod Update, 2015, Vol. 21(4), P. 427–454.

5. *Eppig J.J., Wigglesworth K., Pendola F.L.* The mammalian oocyte orchestrates the rate of ovarian follicular development // Developmental Biology, 2002, Vol. 99, No. 5, P. 2890–2894.

6. *Go´mez E., Rodrı´guez A., Munoz M., Caa-*

mano J.N., Hidalgo C.O., Mora´n E., N. Facal, Dı´ez C. Serum free embryo culture medium improves in vitro survival of bovine blastocysts to vitrification // Theriogenology, 2008, Vol. 69, P. 1013–1021.

7. *Heleil B., Kuzmina T., Novikova N., Torner H. and Alm H.* Effect of prolactin on Developmental Competence of Bovine Oocytes Selected by Brilliant Cresyl Blue Staining // Jornal of Reproduction and Infertility, 2010, No. 1, P. 01–07.

8. *Parrish J.J.* Bovine *in vitro* fertilization: *in vitro* oocyte maturation and sperm capacitation with heparin //Theriogenology, 2014; 81: 67–73.

9. *Sato E.* Intraovarian control of selective follicular growth and induction of oocyte maturation in mammals // Proc. Jpn. Acad., 2015. – Vol. 91, P. 76–91.

10. *Tarkowski A.K.* An air-drying method for chromosomal preparation from mouse eggs // Cytogenetic, 1966, Vol. 1, P. 394–400.

11. ВСВ-диагностика донорских ооцитов Bos Taurusи SusScrofaDomesticus – перспективы использования в клеточных репродуктивных технологиях / Т.И. Кузьмина [и др.] // Вопросы нормативно-правового регулирования в ветеринарии. – 2015. – № 2. – С. 212–214.

12. *Кузьмина Т.И., Торнер Х., Альм Х.* Инновационные эмбриотехнологии в репродукции животных: от фундаментальных исследований к практике // Достижения науки и техники АПК. – 2010. – № 4. – С. 66–68.

Кузьмина Татьяна Ивановна, *д-р биол. наук, проф., зав. лабораторией биологии развития, Всероссийский научно-исследовательский институт генетики и разведения сельскохозяйственных животных. Россия.*

196625, г. Санкт-Петербург - Пушкин, Московское шоссе, 55а.

Тел.: (921) 392-19-47.

Молчанов Алексей Вячеславович, *д-р с.-х. наук, проф., зав. кафедрой «Технология производства и переработки продукции и животноводства», Саратовский государственный аграрный университет имени Н.И. Вавилова». Россия.*

410005, г. Саратов, ул. Соколовая, 335.

Тел.: 89271345802.

Татарская Диана Николаевна, *врач-репродуктолог, Международный Центр Репродуктивной медицины. Россия.*

197350, г. Санкт-Петербург, Комендантский просп., 53.

Тел. (812) 327-19-50; e-mail: dnk-21@mail.ru.

Станиславович Татьяна Ивановна, *канд. с.-х. наук, ведущий научный сотрудник лаборатории биологии развития, Всероссийский научно-исследовательский институт генетики и разведения сельскохозяйственных животных. Россия.*

196625, г. Санкт-Петербург - Пушкин, Московское шоссе, 55а.

Тел.: (921) 392-19-47.

Ключевые слова: *ооцит; пролактин; кумулюс; пикноз; Bos taurus; бриллиантовый кристаллический голубой; эмбрион.*

MODERNIZATION OF THE STAGES OF TECHNOLOGY IN VITRO MATURATION OF DONOR OOCYTES IN BOS TAURUS

Kuzmina Tatyana Ivanovna, *Doctor of Biological Sciences, Professor. Head of the Laboratory of Developmental Biology, Russian Research Institute of Farm Animal Genetics and Breeding. Russia.*

Molchanov Aleksey Vyacheslavovich, *Doctor of Agricultural Sciences, Professor, Head of the chair "Technology of Production and Processing of Animal Products", Saratov State Agrarian University named after N.I. Vavilov. Russia.*

Tatarskaya Diana Nickilaevna, *Reproductologist, International Centre for Reproductive Medicine. Russia.*

Stanislavovich Tatyana Ivanovna, *Candidate of Agricultural Sciences, Leading Researcher of the Laboratory of Developmental Biology, Russian Research Institute of Farm Animal Genetics and Breeding. Russia.*

Keywords: *oocyte; prolactin; cumulus; pycnosis; Bos Taurus; brilliant cresyl blue, embryo.*

Extracorporeal maturation of donors oocytes is the basic method in innovative cellular reproductive technologies (embryo production in vitro, cloning, transgenesis). Assessment of oocyte quality and improving media for maturation are the important tasks of embryo technology. The developmental competence of oocytes in different functional status (growing oocytes and oocytes that have finished growth phase in vivo) were analyzed on the base of comparative evaluation of morphology cumulus and chromatin status of oocytes (meiosis stages and level of degeneration). BCB-diagnostics based on the difference in color of ooplasm after the treatment by the vital dye brilliant cresyl blue was used to determine the functional status of the oocyte. The dynamics of the transformation of chromatin during meiotic maturation of oocytes were evaluated. The findings suggest the possibility of oocytes that have not finished growth phase in vivo can complete nuclear maturation in vitro with the prolongation of culture time. There were no significant differences in the proportion of degenerated oocytes during culture period up to 30 hours in all groups of experiment. System for in vitro maturation of bovine oocytes had evaluated by the BCB like growing oocyte is offered. Use of this system has increased embryo production up to 38%. The effect is achieved by addition into the medium maturation of 50 ng/ml prolactin, by addition the medium after 15 hours from start of culture 10 IU/ml of human chorionic gonadotropin and prolonged time of incubation up to 30 hours.