

ОПТИМИЗАЦИЯ НАНОМАТЕРИАЛОМ СРЕДЫ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ *IN VITRO* ООЦИТОВ КОРОВ

Троцкий П. А., Щербак О. В., Ковтун С. И.

Інститут реaздеия и генетики животных имени М.В. Зубца НААН
08321, Киевская обл., Бориспольский р-н., с. Чубинское, ул. Погребняка, 1, Украина
trotskiy_pa@ukr.net

Abstract: *The aim of the research was to evaluate the effectiveness of the use of nanomaterials in the culture medium of thawed cow oocytes on the viability and further development of embryos in vitro. Biotechnological, cryobiological, morphological and cytogenetic methods were used during the research, as well as methods of statistical data processing. The quality of thawed cow oocytes, which were cultivated with the addition of various concentrations of highly dispersed silica with sucrose (UFS/sucrose), was assessed to study the effect of nanomaterials on the formation of embryos in vitro. For maturation, oocyte-cumulus complexes of cows, which were frozen by vitrification and stored in liquid nitrogen, were used. After thawing and withdrawal of cryoprotectors, oocytes were divided into 4 groups: group A, 0.1% UFS/sucrose was added; group B - 0.01%; group C - 0.001%; group K was the control (without the addition of UFS/sucrose). It was found that the addition of UFS/sucrose at a concentration of 0.001% to the culture medium is more favorable for the further development of frozen-thawed cow oocytes and the formation of embryos in vitro (33.3%, 29 out of 87 inseminated oocytes). When studying the dynamics of cleavage of 2-cell embryos of all studied groups, it was found that the highest cleavage coefficient of embryos was 59.3% in experimental group A and the lowest 40.8% in experimental group C. The cleavage index of 3-4-cell embryos was higher in the experimental group B by 8.7% than in the control (70.6%), which confirms the positive effect of UFS/sucrose (0.001% concentration, group B). The viability of frozen-thawed oocyte-cumulus complexes of cows depends on the composition of the culture medium, which ensures more efficient formation and development of embryos outside the body. The use of 0.001% concentration of UFS/sucrose in the medium for in vitro maturation of frozen-thawed oocyte-cumulus complexes of cows leads to an increase of 12.4-16.6% in the number of obtained embryos after in vitro fertilization of thawed and matured eggs.*

Keywords: *oocyte-cumulus complex, cryopreservation, nanomaterial, in vitro maturation, embryo.*

ВВЕДЕНИЕ

В технологии криоконсервирования гамет, кроме использования криопротекторов, большую роль играет модификация культивирования ооцит-кумулюсных комплексов до и после криоконсервирования. Культивирование полученных эмбрионов из деконсервированных гамет, включает в себя: выяснение роли отдельных компонентов, входящих в состав сред, изучение их свойств и оптимальных концентраций. Криоконсервирование может привести к тому, что ооциты животных подвергаются морфологическим изменениям и функциональным повреждениям из-за содержания липидов в цитоплазме и образования активных форм кислорода [4; 7; 8; 9].

Некоторые результаты исследований указывают на то, что криоконсервирование гамет животных на разных этапах замораживания отражается на развитии эмбрионов, полученных после оплодотворения *in vitro* деконсервированных и созревших вне организма ооцитов. Авторы этих работ изучали влияние сочетания различных криопротекторов в различных концентрациях и соотношениях в среде при замораживании гамет, что также может влиять на созревание деконсервированных ооцитов [2; 3; 5].

Жизнеспособность и дальнейшее развитие вне организма эмбрионов животных, полученных *in vitro* из деконсервированных гамет, в значительной степени зависит от эффективного отбора и применения различных сред для дальнейшего культивирования зародышей. Основной целью методики замораживания ооцит-кумулосных комплексов животных является получение как можно большего количества пригодных для культивирования деконсервированных ооцитов. Как показывают данные многих ученых, решающим при этом является создание условий для замораживания, что обеспечит не только завершения мейотического созревания их хромосом, но и формирование у них способности к оплодотворению с последующим развитием эмбрионов [11; 12].

Целью исследований было оценить эффективность применения наноматериала в среде культивирования деконсервированных ооцитов коров на жизнеспособность и дальнейшее развитие эмбрионов *in vitro*.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Объектом экспериментальных исследований были ооцит-кумулосные комплексы (ОКК) коров. Их получали путем надреза лезвием видимых антральных фолликулов, вымывали средой Дюльбекко, вылавливали пастеровской пипеткой и оценивали по морфологическим признакам под микроскопом. Для замораживания использовали ОКК с плотным или частично разрыхленным кумулосом, имевших гомогенную тонкозернистую ооплазму и неповрежденную прозрачную оболочку. Перед замораживанием ОКК обрабатывали эквilibрационным раствором (10 мин.), затем их переносили в витрификационный раствор (30 с). Эквilibрационный и витрификационный растворы были приготовлены на фосфатно-солевом буфере Дюльбекко с добавлением 20% сыворотки крови коров, которую предварительно инактивировали при 56°C в течение 30 минут. Вывод криопротекторов после размораживания ОКК проводили путем переноса их на 10 минут в раствор 1,0 М сахарозы. Затем ОКК трижды отмывали средой 199, оценивали по морфологическим признакам и переносили в среду для созревания. В ней ОКК культивировали в четырёхлуночных планшетах в течение 24 часов при температуре 38,5°C в атмосфере с 5% CO₂ в воздухе в каплях среды 199 с 20% предварительно инактивированной эструсной сывороткой крови коров, 2,0 мМоль натрия пирувата, 2,92 мМоль кальция лактата, 40 мкг/мл гентамицина. Для культивирования использовали ооцит-кумулосные комплексы коров, которые были заморожены методом витрификации и хранились в жидком азоте. Высокодисперсный кремнезем с сахарозой (ВДК/сахароза) добавляли в среду для культивирования деконсервированных ооцит-кумулосных комплексов коров. После размораживания и вывода криопротекторов гаметы распределяли на 4 группы: группа А добавляли 0,1% ВДК/сахароза; группа В – 0,01%; группа С – 0,001%; группа К была контрольной (без добавления ВДК/сахароза).

ОКК всех групп оплодотворяли после созревания их вне организма. Для оплодотворения яйцеклеток *in vitro* использовали заморожено-размороженную сперму быка. Капацитацию сперматозоидов осуществляли гепарином (100 ед/мл) по методике Parrish J.J. и др. [6]. Совместную инкубацию яйцеклеток и сперматозоидов проводили в термостате при температуре 38,5°C в атмосфере 5% CO₂ в воздухе в каплях среды Fert-TALP. После 12-18 часов совместной инкубации сперматозоидов и яйцеклеток потенциальные зиготы отмывали от сперматозоидов, прилипших к прозрачной оболочке, и переносили в среду CDM для дальнейшего культивирования. Цитогенетические препараты зародышей, полученных после оплодотворения яйцеклеток *in vitro*, готовили по методу Ushijima M. и др. [10]. Статистическую обработку данных проводили по Лакину Г.Ф. [1] с использованием критерия Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Проведена оценка качества созревания деконсервированных ооцитов коров, которые были прокультивированы с добавлением различных концентраций ВДК/сахароза. Наноматериал с сахарозой мы добавляли в среду культивирования деконсервированных ооцит-кумулюсных комплексов коров с целью оценить эмбриональное развитие коров *in vitro*. В таблице 1 представлены результаты применения различных концентраций ВДК/сахароза в среде культивирования деконсервированных ооцитов коров на формирование и дальнейшее развитие *in vitro* эмбрионов.

Таблица 1. Результаты применения наноматериала в среде культивирования деконсервированных ооцитов коров на жизнеспособность и дальнейшее развитие эмбрионов *in vitro*.

Варианты опыта	Количество клеток, подлежащих осеменению <i>in vitro</i>	Количество эмбрионов на стадиях							
		2 клеток		3-4 клеток		5-8 клеток		9-16 клеток	
		n	%	n	%	n	%	n	%
А	96	16	16,7 ^a ±3,8	7	7,3 ^{df} ±2,7	3	3,1 ^g ±1,8	1	1,0 ⁱ ±1,0
В	81	17	20,9 ^{ba} ±4,5	10	12,3 ^d ±3,7	4	4,9 ^{ei} ±2,4	2	2,5 ^{jk} ±1,7
С	87	29	33,3 ^b ±5,1	23	26,4 ^c ±4,7	13	14,9 ^h ±3,8	6	6,9 ^k ±2,7
К	85	17	20,0 ^{ac} ±4,3	12	14,1 ^d ±3,8	6	7,1 ^{gh} ±2,8	4	4,7 ^{jk} ±2,3

Примечания: b : c, d : e, h : l, j : k P< 0,05; a : b, g : h P< 0,01; e : f P< 0,001, критерий Стьюдента.

В таблице разные суперскрипты указывают на вероятную разницу между показателями.

По результатам экспериментальных исследований установлено, что добавление ВДК/сахароза в концентрации 0,001% в среду для культивирования более благоприятное для дальнейшего развития деконсервированных ооцитов коров и формированию эмбрионов *in vitro* (33,3%, 29 из 87 осеменённых яйцеклеток). В контроле (без наноматериала) эмбрионов получено 20,0% (17 из 85 осеменённых яйцеклеток), с 0,1% ВДК/сахароза – 16,7% (16 из 96 осеменённых яйцеклеток) и с 0,01% ВДК/сахароза – 20,9% (17 из 81 осеменённой яйцеклетки). Проведенный сравнительный анализ влияния различных концентраций ВДК/сахароза показал увеличение количества сформированных эмбрионов *in vitro* при добавлении 0,001% концентрации наноматериала, что также привело к получению большего количества зародышей на более поздних стадиях развития.

Таким образом, по результатам экспериментальных исследований установлено, что добавление ВДК/сахароза в концентрации 0,001% в среду для культивирования более благоприятное для дальнейшего развития деконсервированных ооцитов коров. После оплодотворения *in vitro* предварительно созревших вне организма деконсервированных яйцеклеток коров установлено, что добавление в среду для культивирования деконсервированных гамет коров ВДК/сахароза (0,001%) способствует увеличению количества полученных эмбрионов на 16,6-12,4% по сравнению с добавлением 0,1; 0,01% и на 13,3% по сравнению с контрольной группой.

Во время исследования динамики дробления 2-х клеточных эмбрионов крупного рогатого скота всех опытных групп (рис. 1) установлено, что наибольший коэффициент дробления (количество эмбрионов на соответствующей стадии развития от общего количества эмбрионов) эмбрионов 59,3% был в опытной группе (А) и наименьший 40,8% в опытной группе (С). После 48 часов культивирования коэффициент дробления во всех группах был почти одинаковый от 25,9 до 32,4%. Дальнейшее культивирование эмбрионов до 72 часов приводит к уменьшению коэффициента дробления до 11,1% в опытной группе (А) и увеличение коэффи-

циента дробления до 18,3% в группе (С). На четвертые сутки культивирования эмбрионов, полученных из деконсервированных, созревших и оплодотворенных вне организма яйцеклеток коров наблюдали увеличение коэффициента дробления в контрольной группе до 10,3%.

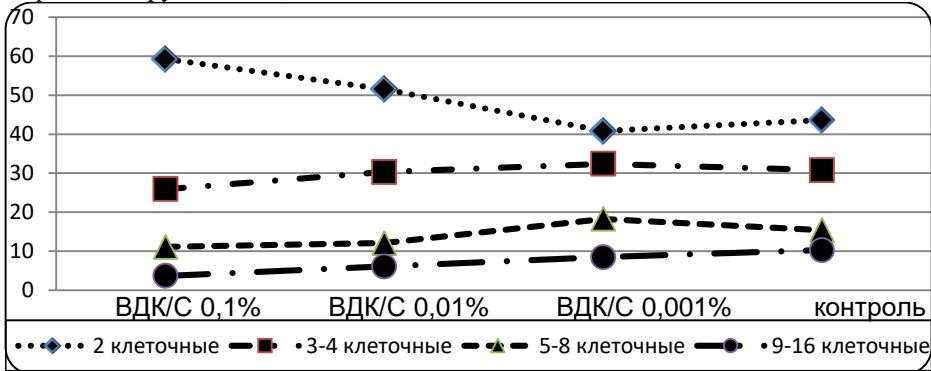


Рисунок 1. Динамика дробления эмбрионов, полученных *in vitro* с деконсервированных и прокультивированных яйцеклеток коров при использовании ВДК/сахароза

Кроме показателя дробления зародышей после оплодотворения *in vitro* не меньшую информативность имеет и индекс дробления эмбрионов (соотношение количества эмбрионов определенной стадии к следующей стадии их развития). Анализируя дальнейшее дробление эмбрионов крупного рогатого скота полученных *in vitro* с деконсервированных и прокультивированных яйцеклеток коров при использовании ВДК/сахароза (рис. 2) установлены значительные колебания индекса дробления. Индекс дробления 3-4 клеточных эмбрионов был выше в опытной группе (С) 79,3% и контрольной (К) 70,6%, что наверняка было связано с влиянием ВДК/сахароза (0,001% концентрации группа С). Дальнейшее культивирование до 5-8 клеточных эмбрионов также приводит к увеличению индекса дробления на 13,6-16,5% в группе С, а в 9-16-ти клеточных эмбрионов наблюдали увеличение индекса дробления до 66,7% в контрольной группе.

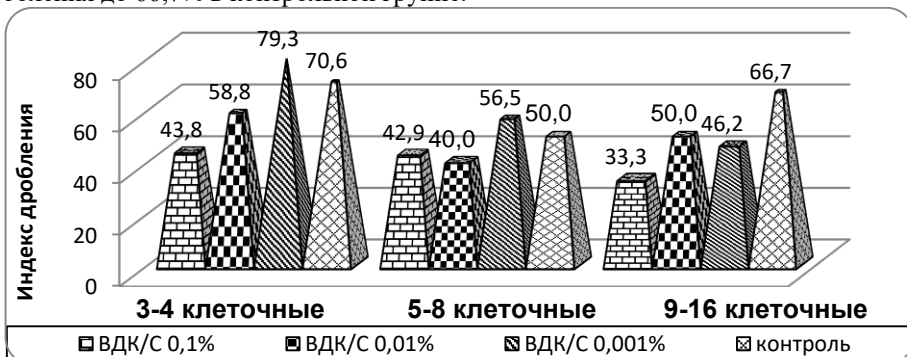


Рисунок 2. Индекс дробления эмбрионов, полученных *in vitro* с деконсервированных и прокультивированных яйцеклеток коров при использовании ВДК/сахароза

Таким образом, по результатам экспериментальных исследований установлено, что жизнеспособность деконсервированных ооцит-кумулосных комплексов коров

зависит от концентрации ВДК/сахароза в среде для культивирования. Установлено преимущество применения 0,001% концентрации ВДК/сахароза при культивировании деконсервированных ооцит-кумулясных комплексов коров, что приводит к увеличению количества сформированных эмбрионов *in vitro*.

ВЫВОДЫ

Жизнеспособность деконсервированных ооцит-кумулясных комплексов коров зависит от состава культуральной среды, обеспечивающей более эффективное формирование и развитие эмбрионов вне организма. Использование 0,001% концентрации ВДК/сахароза в составе среды для *in vitro* культивирования деконсервированных ооцит-кумулясных комплексов коров приводит к увеличению на 12,4 – 16,6% количества полученных эмбрионов крупного рогатого скота после оплодотворения *in vitro* деконсервированных и созревших яйцеклеток.

ЛИТЕРАТУРА

1. Лакин Г.Ф. Биометрия. Москва: Высшая школа, 1990. 351 с.
2. Троцький П.А. Порівняльний аналіз впливу різних еквілібраційних розчинів при кріоконсервуванні ооцит-кумулясних комплексів свинок та подальший розвиток ембріонів *in vitro*. *Науковий вісник «Асканія-Нова»*. 2018. Вип. 11. С. 215-222.
3. Abdel-Gawad E.M.M., Abdel-Halim B.R., Helmy N.A., Badr A.F. Effect of cryoprotective solutions, Ethylene Glycol, Dimethyle-sulfoxide and Ficoll 70 with different combination ratios on vitrification of bovine oocytes and embryos produced *in vitro*. *Asian Journal of Animal and Veterinary Advances*. 2016 Vol. 11. Iss. 10. P. 608-619. DOI: 10.3923/ajava.2016.608.619
4. Bernal-Ulloa S.M., Lucas-Hahn A., Herrmann D., Haderl KG., Aldag P., Baulain U., Niemann H. Oocyte pre-IVM with caffeine improves bovine embryo survival after vitrification. *Theriogenology* 2016. Vol. 86, Iss. 5. P. 1222–1230. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.04.013>
5. Chaves D.F., Corbin E., Almanana C., Locatelli Y., Souza-Fabjan M.G., Bhat M.H., Freitas V.J.F., Mermillod P. Vitrification of immature and *in vitro* matured bovine cumulus–oocyte complexes: Effects on oocyte structure and embryo development. *Livestock Science*. 2017. Vol. 199, 50–56. <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2017.02.022>
6. Parrish J.J., Susko-Parrish J.L., Handrow R.R., Sims M. M., First N. L. Capacitation of bovine spermatozoa by oviduct fluid. *Biol. Reprod*. 1989. Vol 40. Iss. 5. P. 1020–1025.
7. Ruiz-Conca M., Vendrell M., Sabés-Alsina M., Mogas T., López-Bejar M. Coenzyme Q10 supplementation during *in vitro* maturation of bovine oocytes (*Bos taurus*) helps to preserve oocyte integrity after vitrification. *Reprod Domest Anim*. 2017. Vol. 52. Iss. S4. P. 52–54. <https://doi.org/10.1111/rda.13056>
8. Sprícigo J.F.W., Diógenes M.N., Leme L.O., Guimarães A.L., Muterlle C.V., Silva B.D.M., Sola-Oriol D., Pivato I., Silva L.P., Dode M.A.N. Effects of different maturation systems on bovine oocyte quality, plasma membrane phospholipid composition and resistance to vitrification and warming. *PLoS One*. 2015. P. 1-18. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0130164>
9. Sprícigo J.F.W., Morató R., Arcarons N., Yeste M., Dode M.A., López-Bejar M., Mogas T. Assessment of the effect of adding L-carnitine and/or resveratrol to maturation medium before vitrification on *in vitro*-matured calf oocytes. *Theriogenology*. 2017. Vol. 89. P. 47–57. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.09.035>
10. Ushijima M., Okuda M., Nakajama T. et al. Relationship between the cell number and Quality of Day–8 bovine blastocysts. *Proc. 3 rd East Jpn. Soc. Anim. Embr. Trans*. 1988. № 9. P. 37-38.
11. Verma M., Pandey S., Bhat I.A., Mukesh B., Anand J., Chandra V., Sharma G.T. Impact of l-carnitine on lipid content and post thaw survivability of buffalo embryos produced *in vitro*. *Cryobiology*. 2018. Vol. 82. P. 99–105. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2018.04.001>
12. Yashiro I., Tagiri M., Ogawa H., Tashima K., Takashima S., Hara H., Hirabayashi M., Hichi S. High revivability of vitrified-warmed bovine mature oocytes after recovery culture with α -tocopherol. *Reproduction*. 2015. Vol. 149. Iss. 4. P 347–355. DOI: 10.1530/REP-14-0594