ВОЗДЕЙСТВИЕ ДИМЕТИЛГЛИЦЕРОЛАТА КРЕМНИЯ НА СОЗРЕВАНИЕ ООЦИТОВ ОВЕЦ IN VITRO

СТАНИСЛАВОВИЧ Татьяна Ивановна, Всероссийский научно-исследовательский институт генетики и разведения сельскохозяйственных животных – филиал Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный научный центр животноводства – ВИЖ имени академика Л.К. Эрнста» (ВНИИГРЖ)

В ходе исследования установлено положительное действие кремнийсодержащего соединения – диметилглицеролата кремния (ДМГК) на экспансию клеток кумулюса и ядерное созревание ооцитов овец. Данное химическое соединение характеризуется ранозаживляющей, регенерирующей и трансмукозной активностью. Введение в состав культуральной среды в качестве дополнительного компонента 0,2 % ДМГК привело к увеличению уровня ооцитов с высокоэкспандированным кумулюсом (33 % против 21 %, $P < 0,05$). Выход ооцитов, достигших завершающей стадии мейотического созревания, составил в условиях применения ДМГК 88 % против 71 % ($P < 0,05$) в контрольной группе. Полученные результаты предполагают возможность использования ДМГК в технологии экстракорпорального созревания донорских ооцитов овец.

Введение. В современных условиях развития животноводства актуальны разработки в области инновационных клеточных репродуктивных технологий с целью ускоренного размножения высокоценных племенных животных. В организме млекопитающих лишь небольшое количество яйцеклеток способно завершать мейотическое созревание, становясь компетентными к последующему оплодотворению [15]. Особенно важной представляется возможность использования постмортальных яичников животных в качестве источника донорских ооцитов для получения эмбрионов in vitro [13]. Способность яйцеклеток к созреванию, а затем к оплодотворению и развитию вне организма показана на многих видах млекопитающих [3, 8, 16]. Существенную роль в получении продуктивного результата, а именно необходимого количества качественных зрелых ооцитов, играет состав среды для культивирования [4, 6].

Для модификации культуральных сред используются различные дополнительные составляющие (гормоны, структурные элементы фолликула, наноконпозиты, биологически активные вещества и т.д.), способствующие повышению полноценности ооцитов в процессе их созревания in vitro [7–9, 14]. В качестве компонента среды нами использован диметилглицеролат кремния $(\text{CH}_3)_2\text{Si}(\text{C}_3\text{H}_7\text{O}_3)_2 \cdot \text{C}_3\text{H}_8\text{O}_3$, произведенный в институте органического синтеза им. И.Я. Постовского УрО РАН (Россия). ДМГК характеризуется ранозаживляющей, регенерирующей и трансмукозной активностью [10]. Ранее нами было установлено отсутствие цитотоксического эффекта ДМГК на ооциты коров при культивировании [1]. Гидрогели на основе глицератов кремния, являясь физиологически активными веществами, могут использоваться при биотестировании в качестве эффективных транскутанных проводников медикаментозных

средств. Механизмы влияния ДМГК на клетки на сегодняшний день не достаточно изучены, несмотря на имеющиеся литературные данные о его применении в биомедицине и ветеринарии.

Ооциты окружают клетки кумулюса, поддерживающие возможность их полноценного созревания. Они обеспечивают женские половые гаметы питательными веществами и выполняют функцию медиаторов гормональных сигналов при формировании зрелых яйцеклеток в организме млекопитающих [12]. Дополнительное внесение в среду для культивирования клеток кумулюса увеличивает выход преимплантационных эмбрионов почти до 20 % [5].

Цель настоящего исследования – идентифицировать эффекты диметилглицеролата кремния на компетенцию к созреванию донорских ооцитов овец in vitro.

Методика исследований. Яичники овец романовской и эдильбаевской пород (возраст 2–3 года) транспортировали с убойного пункта в термосе в стерильном физиологическом растворе в течение 1,5–2 ч после убоя при температуре 30–35 °С. В лаборатории яичники обрабатывали 70%-м спиртом в течение 3 с, а затем дважды промывали в фосфатно-солевом буфере с добавлением 5 % бычьего сывороточного альбумина (БСА) и 50 МЕ/мл пенициллина. Ооцит-кумулюсные комплексы извлекали из овариальных фолликулов овец (3–5 мм) путем резекции. Эффективность данного способа, а также выбор оптимального диаметра овариальных фолликулов для выделения ооцит-кумулюсных комплексов подтверждены данными других авторов [2, 7].

Для исследования отбирали ооциты с гомогенной ооплазмой, равномерной по ширине зоне пеллюцида, окруженные не менее чем 5–6 слоями клеток кумулюса. Наличие клеток кумулюса, количество их слоев, а также степень экспансии (разрыхления) после культивирования опреде-

ляли с помощью стереоскопического микроскопа (МБС-9 при увеличении 2×14). Культивирование ооцит-кумулюсных комплексов осуществляли в среде TC-199 с глутамаксом-1 (Gibco, Invitrogen Co, Scotland, UK) с добавлением 25 мМ пирувата натрия, 100 МЕ/мл пенициллина G, 100 мкг/мл стрептомицина, 10 % фетальной бычьей сыворотки (Gibco, Invitrogen Co, Scotland, UK) в течение 24 ч при температуре 39°C , в атмосфере, содержащей 5 % CO_2 с высокой влажностью.

В среду опытных групп добавляли 0,2 % ДМГК от объема среды [1]. Для оценки ядерного хроматина ооциты, очищенные от клеток кумулюса, окрашивались в растворе фосфатного буфера и глицерина с добавлением 25 мг флуоресцентного красителя Hoechst 33258, а затем исследовались с помощью микроскопа Carl Zeiss Axio Imager A 2 m. Все использованные в исследовании реагенты, за исключением обозначенных, производства фирмы Sigma-Aldrich (USA).

Обработку результатов проводили с помощью пакета статистической программы SigmaStat (Jandel Scientific Software, USA). Полученные в опытных и контрольных группах данные сравнивали по критерию χ^2 -квадрат. Достоверность различия сравниваемых средних значений оценивали при трех уровнях значимости ($P < 0,05$; $P < 0,01$; $P < 0,001$).

Результаты исследований. К основным морфологическим критериям полноценности женской гаметы относят признаки самого ооцита и окружающих его кумулюсных клеток. Качество ооцита и его компетенция к дальнейшему развитию непосредственно зависят от числа слоев и функционального состояния клеток кумулюса [11]. При селекции донорской популяции ооцитов предпочтение отдается клеткам с компактным кумулюсом. Однако после культивирования именно экспандированный (разрыхленный) кумулюс служит одним из косвенных подтверждений завершения ядерно-цитоплазматического созревания ооцита [7]. Использование 0,2 % ДМГК в среде для культивирования значительно уменьшило уровень ооцитов овец с низкой степенью экспансии кумулюсных клеток (13 % против 37 %, $^{a,b}P < 0,001$). Доля ооцитов со средней степенью экспансии кумулюса увеличилась на 12 % в опытной группе по сравнению с контролем (54 % против 42 %, $^{c,d}P < 0,05$). В наших исследованиях показано, что введение в состав культуральной среды в качестве дополнительного компонента 0,2 % ДМГК увеличило долю ооцитов с высокоэкспандированным кумулюсом по завершению культивирования (33 % против 21 %, $^{e,f}P < 0,05$), рис. 1.

Использование ДМГК в технологии экстракорпорального дозревания ооцитов оказало положительный эффект, который выражался в повышении доли клеток, достигших стадии ядерного созревания (метафазы-II), по сравнению с контролем (88 % против 71 %, $^{a,b}P < 0,05$), рис. 2.

Анализ деструктивных изменений в ооцитах показал, что культивирование ооцитов овец в

Рис. 1. Влияние ДМГК на морфологию кумулюсных клеток ооцитов овец (n ооцитов – 337; 3 повторности; время культивирования 24 ч; $^{a,b}P < 0,001$, $^{c,d,e,f}P < 0,05$ (критерий χ^2))

*Контроль: TC-199 с глутамаксом-1+25 мМ пирувата натрия+100 МЕ/мл пенициллина G+100 мкг/мл стрептомицина+10 % фетальной бычьей сыворотки.

**Опыт: TC-199 с глутамаксом-1+25 мМ пирувата натрия+100 МЕ/мл пенициллина G+100 мкг/мл стрептомицина+10 % фетальной бычьей сыворотки+0,2 % ДМГК

Рис. 2. Влияние ДМГК на статус хроматина ооцитов овец (n ооцитов – 285; 3 повторности; время культивирования 24 ч; $^{a,b,c,d}P < 0,05$ (критерий χ^2))

*Контроль: TC-199 с глутамаксом-1+25 мМ пирувата натрия+100 МЕ/мл пенициллина G+100 мкг/мл стрептомицина+10 % фетальной бычьей сыворотки

**Опыт: TC-199 с глутамаксом-1+25 мМ пирувата натрия+100 МЕ/мл пенициллина G+100 мкг/мл стрептомицина+10 % фетальной бычьей сыворотки+0,2 % ДМГК

условиях использования ДМГК в концентрации 0,2 % в течение 24 ч снизило уровень дегенерированных ооцитов по сравнению с контролем на 8 % (5 % против 13 %, $^{c,d}P < 0,05$).

Заключение. Усовершенствование культуральных сред, обеспечивающее полноценное созревание ооцитов in vitro, с использованием синтезированных химических соединений позволит максимально реализовать имеющийся потенциал гамет в овариальных фолликулах животных.

Использование 0,2 % ДМГК в качестве дополнительного компонента среды благоприятно сказалось на функциональной активности кумулюсных клеток (степень экспансии клеток кумулюса) и ядерном созревании ооцитов, что позволяет рекомендовать его в качестве компонента

сред для культивирования ооцитов овец.

Работа выполнена при финансовой поддержке Минобрнауки (Госзадание № АААА-А18-118021590132-9).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Воздействие кремнийсодержащих соединений на развитие доимплантационных эмбрионов *Bos Taurus* / И.В. Чистякова [и др.] // Вопросы нормативно-правового регулирования в ветеринарии. – 2018. – № 3. – С. 105–108.

2. Выход ооцитов из яичников овец в зависимости от физиологического статуса животных и эффективность различных способов изоляции ооцитов / Е.С. Усенбеков [и др.] // Проблемы взаимодействия науки и общества: сб. науч. тр. – Пермь, 2019. – С. 102–105.

3. Колесникова А.А., Шигимага В.А., Смольянинова Е.И. Влияние стимуляции созревания на электропроводность и оплодотворяемость ооцитов мыши // Фундаментальные исследования. – 2013. – № 4-4. – С. 869–899.

4. Кузьмина Т.И., Станиславович Т.И., Молчанов А.В. Влияние наночастиц высокодисперсного кремнезема на показатели криорезистентности девитрифицированных ооцит-кумулюсных комплексов *Bos taurus* // Аграрный научный журнал. – 2019. – № 3. – С. 29–34.

5. Роль соматических клеток фолликула в созревании ооцитов и получении эмбрионов коров *in vitro* / И.В. Кириллова [и др.] // Материалы 7-й Междунар. науч.-практ. конф.: сб. науч. тр. – Краснодар, 2014. – Т. 3. – № 1. – С. 57–60.

6. Clarke H. Control of mammalian oocyte development by interactions with the maternal follicular environment // Results and problems in cell differentiation, 2017, Vol. 63, P. 17–41.

7. Crocoto L. F., Marques F. W. C., Ackermann C. L. et al. Time course of the meiotic arrest in sheep cumulus-oocyte complexes treated with roscovitine // Zygote, 2016, Vol. 24(2), P. 310–318.

8. Germoush M.O., Al-Mutary M.G., Al-Himaidi A.R. Effects of follicular fluid on developmental competence and gene expression of *in vitro* fertilized sheep embryos // Pakistan journal of zoology, 2018, Vol. 4(50), P. 1267–1277.

9. Grossman D., Kalo D., Gendelman M., Roth Z. Effect of di-(2-ethylhexyl) phthalate and mono-(2-ethylhexyl)

phthalate on *in vitro* developmental competence of bovine oocytes // Cell Biology and Toxicology, 2012, Vol. 28, P. 383–396.

10. Khonina T.G., Safronov A.P., Shadrina E.V., Ivanenko M.V., Suvorova A.I., Chupakhin O.N. Mechanism of structural networking in hydrogels based on silicon and titanium glycerolates // Journal of Colloid and Interface Science, 2012, Vol. 365, P. 81–89.

11. Nakamura Y., Tajima S., Kikuchi K. The quality after culture *in vitro* or *in vivo* of porcine oocytes matured and fertilized *in vitro* and their ability to develop to term // Animal Science, 2017, Vol. 88, No. 12, P. 1916–1924.

12. Pawlak P., Chabowska A., Malyszka N., Lechniak D. Mitochondria and mitochondrial DNA in porcine oocytes and cumulus cells // Mitochondrion, 2016, Vol. 27, P. 48–55.

13. Peng X., Yang M., Wang L., Tong C., Guo Z. *In vitro* culture of sheep lamb ovarian cortical tissue in a sequential culture medium // Journal Assist Reproduction and Genetic, 2010, Vol. 27(5), P. 247–257.

14. Tareq K.M., Akter Q.S., Khandoker M.A., Tsujii H. Selenium and vitamin E improve the *in vitro* maturation, fertilization and culture to blastocyst of porcine oocytes // Journal of Reproduction and Development, 2012, P. 621–628.

15. Vuong L.N., Ho T.M., Gilchrist R.B., Smitz J. The Place of *in vitro* maturation in assisted reproductive technology // Journal of Fertility and Reproduction, 2019, Vol. 1(01), P. 11–15.

16. Yuan Ye., Krisher R.L. *In vitro* maturation (IVM) of porcine oocytes // Journal of Molecular Biology and Methods, 2012, Vol. 825, P. 183–198.

Станиславович Татьяна Ивановна, канд. с.-х. наук, ведущий научный сотрудник лаборатории биологии развития, Всероссийский научно-исследовательский институт генетики и разведения сельскохозяйственных животных – филиал Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный научный центр животноводства – ВИЖ имени академика Л.К. Эрнста» (ВНИИГРЖ). Россия.

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

Тел.: (812) 451-76-63.

Ключевые слова: ооцит; кумулюсные клетки; созревание *in vitro*; фолликул; диметилглицеролат кремния (ДМГК); овцы.

EFFECT OF SILICON DIMETHYLGLYCEROLATE ON RIPEING OF SHEEP OOCYTES *IN VITRO*

Stanislavovich Tatyana Ivanovna, Candidate of Agricultural Sciences, Leading Researcher All-Russian Research Institute of Genetics and Breeding of Farm Animals - branch of Federal State Budget Scientific Institution "Federal Scientific Center for Animal Husbandry - VIZH named after academician L. K. Ernst", Russia.

Keywords: oocyte; cumulus cells; *in vitro* maturation; follicle; silicon dimethylglycerolate (SDMG); sheeps.

In the presented study, a positive effect of a silicon-containing compound, silicon dimethylglycerolate (SDMG), on cells of cumulus expansion and nuclear

maturation of sheep oocytes was established. This chemical compound is characterized by wound healing, regenerating and transmucosal activity. The introduction of 0.2% SDMG into the composition of the culture medium as an additional component increased the level of oocytes with expanded cumulus (33% versus 21%, $P < 0.05$). The yield of oocytes that reached the final stage of meiotic maturation was 88% under the conditions of using SDMG versus 71% ($P < 0.05$) in the control group. The results obtained suggest the possibility of using SDMG in the technology of extracorporeal maturation of donor sheep oocytes.