

Г. Н. Сингина, Е. Н. Шедова, И. Ю. Лебедева

Влияние эпидермального фактора роста на качество яйцеклеток коров в процессе старения *in vitro*

Аннотация. В представленной работе был исследован характер действия эпидермального фактора роста (ЭФР) на возрастные трансформации М-II хромосом в стареющих ооцитах домашней коровы (*Bos taurus*), а также их способность к развитию после оплодотворения *in vitro*. С этой целью созревшие *in vitro* (20 ч) ооциты коров дополнительно культивировали в составе ооцит-кумулюсных комплексов в течение 24 или 12 ч в присутствии и в отсутствие ЭФР (1–500 нг/мл). После культивирования яйцеклетки использовали соответственно для цитологического анализа или подвергали процедуре оплодотворения *in vitro*. В контроле доля ооцитов с деструктивными изменениями хромосом составила 58.3 ± 3.2 %. В концентрации 1–50 нг/мл ЭФР не влиял на частоту соответствующих деструктивных процессов и повышал их в концентрации 500 нг/мл ($P < 0.001$). Доля раздробившихся ооцитов оплодотворенных *in vitro* после пролонгированного культивирования (12 ч) не различалась между группами и варьировала от 71.5 до 76.5%. В свою очередь введение исследуемого ростового фактора в концентрации 10 нг/мл в среду старения повышало долю развития blastocysts с 9.8 ± 1.2 до 18.2 ± 1.5 ($P < 0.01$). Полученные данные свидетельствуют о том, что ЭФР способен повышать компетенцию яйцеклеток коров к дальнейшему эмбриональному развитию, снижающуюся в процессе их старения *in vitro*. Также очевидно, что данное влияние ЭФР не связано с воздействием на состояние хромосом.

Ключевые слова: эпидермальный фактор роста, ооцит, старение *in vitro*.

Авторы:

Сингина Галина Николаевна — кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник, руководитель лаборатории; e-mail: g_singina@mail.ru;

Шедова Екатерина Николаевна — научный сотрудник; e-mail: shedvek@yandex.ru;

Лебедева Ирина Юрьевна — доктор биологических наук, главный научный сотрудник, руководитель лаборатории; e-mail: irledv@mail.ru.

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный научный центр животноводства — ВИЖ имени академика Л. К. Эрнста», 142132, Московская область, Городской округ Подольск, поселок Дубровицы, д. 60.

Введение. Получение *in vitro* (IVP) эмбрионов имеет широкие перспективы применения в научных и медицинских исследованиях, а также в работах направленных на поддержание воспроизводства, сохранение генетического разнообразия и создание животных с заданными свойствами. К настоящему времени достигнут существенный прогресс в разработке данных методов, однако потенциал к эмбриональному развитию созревших *in vitro* яйцеклеток по-прежнему остается значительно более низким, чем у яйцеклеток, созревших *in vivo* [1]. Одной из причин является то, что в зрелых ооцитах в отсутствие активирующих стимулов вслед за завершением первого деления мейоза иницируются процессы старения, которые ухудшают качество яйцеклеток и их компетенцию

к эмбриональному развитию [2–4]. Однако этот аспект снижения качества яйцеклеток, к сожалению, до сих пор не достаточным образом учитывался при разработке научных подходов к модификации систем культивирования ооцитов животных *in vitro*.

Для изучения *in vitro* процесса старения яйцеклеток, находящихся на стадии метафазы-II, используют метод пролонгированного культивирования ооцитов, позволяющий индуцировать в них молекулярные и клеточные изменения, сходные с таковыми, происходящими *in vivo*. Показана возможность торможения, по крайней мере, частично, возрастных трансформаций в ооцитах в присутствии различных химических реагентов, например,

кофеина, диметилсульфоксида, пирувата и дитиотрептола [3, 5–7]. Потенциальными мишенями для воздействия в первую очередь являются такие процессы, как апоптоз, деструктивные изменения метафазных хромосом и окислительный стресс [3, 8].

В представленной работе в качестве потенциального регулятора качества зрелых ооцитов был исследован эпидермальный фактор роста (ЭФР), целесообразность использования которого была обусловлена в первую очередь его антиапоптотическими свойствами [9].

Материалы и методы исследований. Объектом исследования служили ооцит-кумулюсные комплексы (ОКК), выделенные из фолликулов коров. Для их получения яичники, отобранные после убоя, доставляли в лабораторию в течение 4–5 часов при 30–35°C. Изолирование ОКК проводили методом рассечения антральных фолликулов в среде ТС-199, содержащей 5% ФБС (фетальная бычья сыворотка), 10 мкг/мл гепарина, 0,2 мМ пирувата натрия и 50 мкг/мл гентамицина.

ОКК первоначально культивировали по 30–35 ооцитов в 500 мкл среды ТС-199, содержащей 10% ФБС, 1 мМ пирувата натрия, 50 мкг/мл гентамицина, а также 10 мкг/мл фолликулостимулирующего и 5 мкг/мл лютеинизирующего гормонов в течение 20 часов. Затем их переносили в ту же среду, но без ФСГ и ЛГ и культивировали дополнительно 12–24 часа в присутствии или отсутствии EGF (1–50 и 1–500 нг/мл соответственно). После пролонгированного культивирования яйцеклетки подвергали соответственно процедуре оплодотворения или цитологическому анализу.

Для цитологического анализа ОКК освобождали от окружающих их кумулюсных клеток и фиксировали по методу Тарковского [10], с небольшими модификациями [11]. Состояние хромосом в ооцитах оценивали в соответствии с известными морфологическими критериями [12–13]. К деструктивным изменениям метафазных хромосом относили следующие морфологические аномалии: деспирализацию и потерю четких очертаний, частичное слипание, слипание с образованием единой комковатой массы, фрагментацию. Общее число ооцитов, подвергшихся партеногенетической активации, определяли путем суммирования числа раздробившихся эмбрионов и числа ооцитов, достигших стадии анафазы II — телофазы II или содержащие пронуклеус [3].

Экстракорпоральное оплодотворение стареющих *in vitro* ооцитов (12 часов) проводили, как описано ранее [14]. ОКК промывали однократно в среде Fert-TALP, модифицированной внесением 10 мкг/мл гепарина, 20 мкМ пенициллина, 10 мкМ гипотаурина и 1 мкМ эпинефрина, и пе-

реносили в 4-луночные планшеты, содержащие 400 мкл той же среды, покрытой равным объемом минерального масла. Активные сперматозоиды, полученные методом «swim-up» [15], добавляли в лунки с созревшими ооцитами в конечной концентрации 1×10^6 сперматозоидов/мл. Во всех экспериментах для оплодотворения ооцитов использовали заморожено-оттаянную сперму одного быка.

Через 18–20 ч совместной инкубации ооциты отмывали от сперматозоидов и переносили в среду CR1aa [16] для культивирования. На 2-й день после оплодотворения ооцитов проводили морфологическую оценку раздробившихся зигот, на 7-й день определяли число эмбрионов, развившихся до стадий поздней морулы и бластоцисты.

Для оценки состояния ядерного материала эмбрионов, полученные морулы и бластоцисты фиксировали в 4% параформальдегиде, подвергали процедуре пермеабилзации в 0,1%-ом растворе цитрата натрия, содержащем 0,5% Тритона X-100, окрашивали DAPI, после чего переносили на сухое обезжиренное стекло и заключали в среду Vectashield.

Эксперименты были выполнены в 3–4 независимых повторностях. Данные, обрабатывали при помощи компьютерной программы SigmaStat.

Результаты и обсуждение. В зрелых ооцитах в отсутствие активирующих стимулов вслед за завершением первого деления мейоза инициируются изменения, которые ухудшают качество созревших яйцеклеток и их компетенцию к эмбриональному развитию. Идентификация биологически уместных факторов, отвечающих за механизмы защиты ооцитов от преждевременного старения, призваны решить данную проблему [2].

Поскольку ЭФР может позитивно модулировать созревание ооцитов и их способность к эмбриональному развитию, есть вероятность, что подобным образом данный ростовой фактор влияет и на стареющие ооциты [17]. Для проверки данного предположения, в настоящей работе было изучено влияние ЭФР на возрастные трансформации М-II хромосом в завершивших созревание ооцитах коров, а также их способность к развитию после оплодотворения *in vitro*.

В экспериментах по изучению морфологии метафазных хромосом зрелые ооциты культивировали в присутствии 1–500 нг/мл ЭФР. Результаты цитологического анализа представлены в таблице 1. В контроле доля ооцитов с деструктивными изменениями хромосом составила $58.3 \pm 3.2\%$ от общего числа клеток, достигших стадии метафазу-II, выход которых не различался между

Таблица 1. Влияние ЭФР в различных концентрациях на состояние хромосом в стареющих ооцитах при пролонгированном культивировании ОКК (24 ч)

Среда пролонгированного культивирования	Число ооцитов	Созревание, %	Доля созревших ооцитов с аномальными изменениями хромосом, %	Доля активированных ооцитов, %
Контроль	60	77.4 ± 6.5	58.3 ± 3.2 ^а	10.0 ± 5.3
1 нг/мл ЭФР	55	79.1 ± 3.1	50.3 ± 4.2 ^б	0
10 нг/мл ЭФР	58	76.3 ± 2.9	54.8 ± 4.3 ^б	0
50 нг/мл ЭФР	63	77.2 ± 11.2	64.2 ± 2.5 ^в	0
500 нг/мл ЭФР	58	81.5 ± 6.5	81.0 ± 3.0 ^г	8.8 ± 4.6

Примечание. Достоверные различия между сравниваемыми группами: ^а, ^г $P < 0.01$, ^б, ^г $P < 0.001$, ^в, ^г $P < 0.05$.

Таблица 2. Влияние ЭФР в среде пролонгированного культивирования (12 ч) на способность зрелых стареющих in vitro ооцитов к эмбриональному развитию

Среда пролонгированного культивирования	Число ооцитов	Дробление, %	Развитие до стадии поздней морулы/бластоцисты		
			% от числа ооцитов	% от числа эмбрионов	Общее число ядер
Контроль	122	71,5 ± 2,5	9,7 ± 1,1 ^а	13,8 ± 2,0 ^в	46,8 ± 2,7
1 нг/мл ЭФР	123	76,5 ± 1,9	13,0 ± 1,4	17,0 ± 1,7	47,1 ± 2,3
10 нг/мл ЭФР	133	75,8 ± 2,9	18,2 ± 1,5 ^б	24,1 ± 2,0 ^г	46,1 ± 3,8
50 нг/мл ЭФР	140	75,3 ± 3,9	14,2 ± 1,1	18,9 ± 1,6	49,9 ± 2,5

Примечание. Достоверные различия между сравниваемыми группами: ^а, ^б, ^в, ^г $p < 0,01$.

группами и колебался от 76,3 до 79,1%. Влияние ЭФР на данные возрастные трансформации зависело от его концентрации в среде старения. Доля яйцеклеток с аномальной морфологией хромосом существенно повышалась по сравнению с контролем при 500 нг/мл ЭФР ($P < 0.001$). В случае использования более низких концентраций данного ростового фактора (1–50 нг/мл), частота соответствующих деструктивных процессов не изменялась. Не обнаружено влияния ЭФР в среде старения на относительное число созревших ооцитов, подвергшихся спонтанной партеногенетической активации.

Учитывая негативное влияние высоких концентраций ЭФР на качество стареющих in vitro ооцитов, в экспериментах по экстракорпоральному оплодотворению его вносили в среду пролонгированного культивирования только в концентрациях 1, 10 и 50 нг/мл. Экспериментальные данные показали, что существует концентрационная зависимость влияния ЭФР на развитие оплодотво-

ренных ооцитов in vitro (табл. 2). При 10 нг/мл данный гормон не влиял на долю раздробившихся яйцеклеток (75,8 ± 2,9% против 71,5 ± 2,5% в контроле), но повышал с 9,8 ± 1,2% до 18,2 ± 1,5% ($P < 0.01$) выход эмбрионов, достигших стадии морулы/бластоцисты. Увеличение до 50 нг/мл и уменьшение до 1 нг/мл не способствовало улучшению развития эмбрионов и не влияло на долю дробления. Следует также отметить, что ни в одной из исследуемых концентраций ЭФР не влиял на состояние ядерного материала полученных морул/бластоцист, среднее число ядер в которых колебалось от 46,1 до 49,9.

Заключение. Эпидермальный фактор роста способен повышать компетенцию ооцитов коров к дальнейшему эмбриональному развитию, снижающуюся в процессе их старения in vitro. Это действие ЭФР может быть обусловлено способностью поддерживать качество цитоплазмы яйцеклеток, и не связано с воздействием на состояние хромосом.

Работа выполнена при финансовой поддержке Минобрнауки России
(проект № АААА-А18-118021590132-9)

Литература

1. Lonergan P. State of the art embryo technologies in cattle. Review / P. Lonergan // Soc. Reprod. Fertil. — 2007. — Vol. 64 (Suppl). — P. 315–25.
2. Y. L. Miao Oocyte aging: cellular and molecular changes, developmental potential and reversal possibility / Y. L. Miao, K. Kikuchi, Q. Y. Sun, H. Schatten // Hum. Reprod. Update. — 2009. — Vol. 15. — P. 573–585.

3. Lebedeva I. Y. Dynamics of morphofunctional changes in aging bovine ova during prolonged culture in vitro / I. Y. Lebedeva, G. N. Singina, A. V. Lopukhov, N. A. Zinovieva // Cell Tissue Biol. — Vol. 8. — P. 258–266.
4. Singina G. Pole of pituitary hormones and cumulus cells in modulating the developmental capacity of aging bovine oocytes / G. Singina, I. Lebedeva, T. Taradajnic, N. Zinovieva // Reprod. Fertil. Dev. — 2015. — Vol. 27. — P. 204.
5. Lee J. H. Caffeine treatment prevents age-related changes in ovine oocytes and increases cell numbers in blastocysts produced by somatic cell nuclear transfer / J. H. Lee, K. H. Campbell // Cloning Stem Cells. — 2008. — Vol. 10. — P. 381–390.
6. Liu N. N. Pyruvates prevents aging of mouse oocytes / Liu, Y. G. Wu, G. C. Lan, H. S. Sui, L. Ge, J. Z. Wang, Y. Liu, T. W. Qiao, J. H. Tan // Reproduction. — 2009. — Vol. 138. — P. 223–234.
7. Choi T. Dimethylsulfoxide inhibits spontaneous oocyte fragmentation and delays inactivation of maturation promoting factor (MPF) during the prolonged culture of ovulated murine oocytes in vitro / T. Choi // Cytotechnology. — 2011. — Vol. 63. — P. 279–284.
8. Takahashi T. Molecular mechanism of poor embryo development in postovulatory aged oocytes: mini review / T. Takahashi, H. Igarashi, M. Amita, S. Hara, K. Matsuo, H. Kurachi // J. Obstet. Gynaecol. Res. — 2013. — Vol. 39. — P. 1431–1439.
9. Markstrom E. Survival factors regulating ovarian apoptosis-dependence on follicle differentiation / E. Markstrom, E. C. Svensson, R. Shao, B. Svanberg, H. Biling // Reproduction. — 2002. — Vol. 123. — P. 23–30.
10. Tarkowski A. K. An air-drying method for chromosome preparations from mouse eggs / A. K. Tarkowski // Cytogenetics. — 1966. — Vol. 5. — P. 394–400.
11. Kuzmina T. I. Effects of prolactin on intracellular stored calcium in the course of bovine oocyte maturation in vitro / T. I. Kuzmina, I. Y. Lebedeva, H. Torner, H. Alm, V. Y. Denisenko // Theriogenology. — 1999. — Vol. 51. — P. 1363–1374.
12. Эрнст Л. К. Нарушение мейоза при культивировании ооцитов коров / Л. К. Эрнст, Б. Е. Свиридов, Л. Д. Галиева, А. К. Голубев, А. П. Янушка, М. Н. Пименова // Цитология. — 1980. — Т. 22. — № 4. — С. 475–477.
13. Homa S. T. Effects of cyclic AMP on the spontaneous meiotic maturation of cumulus-free bovine oocytes cultured in chemically defined medium / S. T. Homa // J. Exp. Zool. — 1988. — Vol. 248. — P. 222–231.
14. Сингина Г. Н. Получение эмбрионов in vitro методом межвидового оплодотворения яйцеклеток коров (*Bos taurus*) семенем зубра (*Bison bonasus*) / Г. Н. Сингина, В. А. Багиров, С. С. Данч, Т. Е. Тарадайник, А. В. Доцев, Н. А. Зиновьева // Сельскохозяйственная биология. — 2016. — Т. 51. — № 6. — С. 824–829.
15. Parrish J. J. First Bovine in vitro fertilization with frozen-thawed semen / J. J. Parrish, J. L. Susko-Parrish, M. L. Leibfried-Rutledge, E. S. Critser, W. H. Eyestone, N. L. // Theriogenology. — 1986. — Vol. 25. — P. 591–600.
16. Rozenkrans C. F. First Effect of free amino acids and vitamins on cleavage and developmental rate of bovine zygotes in vitro / C. F. Rozenkrans, N. L. // J. Anim. Science. — 1994. — Vol. 72. — P. 434–437.
17. Conti M. Role of the epidermal growth factor network in ovarian follicles / M. Conti, M. Hsieh, J. Y. Park, Y. Q. Su // Mol. Endocrinol. — 2006. — Vol. 20. — P. 715–723.

Singina G., Shedova E., Lebedeva I.

The effect of epidermal growth factor on quality of bovine oocytes aged in vitro

Abstract. Effect of epidermal growth factor (EGF) on modifications of metaphase-II (M-II) chromosomes in aged bovine oocytes and their developmental competence after in vitro fertilization was investigated in the present work. To this, the matured in vitro (for 20 h) cumulus-enclosed oocytes (GEOs) cultured for additional 24 or 12 h in the absence (Control) and in presence of EGF (1–500 ng/ml) and then used respectively for cytogenetic analysis or for in vitro fertilization. In the Control the rate of GEOs with destructive modifications of M-II chromosomes was 58.3 ± 3.2 %. EGF did not affect on the frequency of abnormal chromosome modifications at concentrations of 1–50 ng/ml and increased this frequency at the concentration 500 ng/ml. After the 12 h prolonged culture the cleavage rate of fertilized oocytes did not differ between groups, varying from 71.5 to 76.5%. Mean-

while the addition of EGF at concentration of 10 ng/ml to the aging medium led to an increase in the yield of blastocysts from 9.7 ± 1.1 % (Control) to 18.2 ± 1.5 % ($p < 0.01$). The data suggest that EGF is able to improve the competence for development of in vitro ageing bovine oocytes and that this effect of EGF is not related to the modeling of chromosome quality.

Keywords: epidermal growth factor, oocyte, in vitro aging.

Authors:

Singina G. — PhD (Biol. Sci.), head of laboratory; e-mail: g_singina@mail.ru;

Shedova E. — researcher; e-mail: shedvek@yandex.ru;

Lebedeva I. — Dr. Habil. (Biol. Sci.), head of laboratory; e-mail: irledv@mail.ru.

Federal Science Center for Animal Husbandry named after Academy Member L. K. Ernst, 142132, Moscow region, Podolsk city district, Dubrovitsy settlement, 60.

References

1. Lonergan P. State of the art embryo technologies in cattle. Review / P. Lonergan // Soc. Reprod. Fertil. — 2007. — Vol. 64 (Suppl). — P. 315–25.
2. Y. L. Miao Oocyte aging: cellular and molecular changes, developmental potential and reversal possibility / Y. L. Miao, K. Kikuchi, Q. Y. Sun, H. Schatten // Hum. Reprod. Update. — 2009. — Vol. 15. — P. 573–585.
3. Lebedeva I. Y. Dynamics of morphofunctional changes in aging bovine ova during prolonged culture in vitro / I. Y. Lebedeva, G. N. Singina, A. V. Lopukhov, N. A. Zinovieva // Cell Tissue Biol. — Vol. 8. — P. 258–266.
4. Singina G. Pole of pituitary hormones and cumulus cells in modulating the developmental capacity of aging bovine oocytes / G. Singina, I. Lebedeva, T. Taradajnic, N. Zinovieva // Reprod. Fertil. Dev. — 2015. — Vol. 27. — P. 204.
5. Lee J. H. Caffeine treatment prevents age-related changes in ovine oocytes and increases cell numbers in blastocysts produced by somatic cell nuclear transfer / J. H. Lee, K. H. Campbell // Cloning Stem Cells. — 2008. — Vol. 10. — P. 381–390.
6. Liu N. N. Pyruvates prevents aging of mouse oocytes / Liu, Y. G. Wu, G. C. Lan, H. S. Sui, L. Ge, J. Z. Wang, Y. Liu, T. W. Qiao, J. H. Tan // Reproduction. — 2009. — Vol. 138. — P. 223–234.
7. Choi T. Dimethylsulfoxide inhibits spontaneous oocyte fragmentation and delays inactivation of maturation promoting factor (MPF) during the prolonged culture of ovulated murine oocytes in vitro / T. Choi // Cytotechnology. — 2011. — Vol. 63. — P. 279–284.
8. Takahashi T. Molecular mechanism of poor embryo development in postovulatory aged oocytes: mini review / T. Takahashi, H. Igarashi, M. Amita, S. Hara, K. Matsuo, H. Kurachi // J. Obstet. Gynaecol. Res. — 2013. — Vol. 39. — P. 1431–1439.
9. Markstrom E. Survival factors regulating ovarian apoptosis-dependence on follicle differentiation / E. Markstrom, E. C. Svensson, R. Shao, B. Svanberg, H. Biling // Reproduction. — 2002. — Vol. 123. — P. 23–30.
10. Tarkowski A. K. An air-drying method for chromosome preparations from mouse eggs / A. K. Tarkowski // Cytogenetics. — 1966. — Vol. 5. — P. 394–400.
11. Kuzmina T. I. Effects of prolactin on intracellular stored calcium in the course of bovine oocyte maturation in vitro / T. I. Kuzmina, I. Y. Lebedeva, H. Torner, H. Alm, V. Y. Denisenko // Theriogenology. — 1999. — Vol. 51. — P. 1363–1374.
12. Ernst L. K. Disruption of meiosis in the cultivation of cow oocytes / L. K. Ernst, B. E. Sviridov, L. D. Galiyeva, A. K. Golubev, A. P. Yanushka, M. N. Pimenova // Cytology. — 1980. — V. 22. — № 4. — P. 475–477.
13. Homa S. T. Effects of cyclic AMP on the spontaneous meiotic maturation of cumulus-free bovine oocytes cultured in chemically defined medium / S. T. Homa // J. Exp. Zool. — 1988. — Vol. 248. — P. 222–231.
14. Singina G. N. Obtaining of embryos in vitro by the method of interspecific fertilization of cow eggs (*Bos taurus*) with a bison seed (*Bison bonasus*) / G. N. Singina, V. A. Bagirov, S. S. Danch, T. E. Taradayan, A. V. Dotsev, N. A. Zinovyeva // Agricultural Biology. — 2016. — V. 51. — № 6. — P. 824–829.
15. Parrish J. J. First Bovine in vitro fertilization with frozen-thawed semen / J. J. Parrish, J. L. Susko-Parrish, M. L. Leibfried-Rutledge, E. S. Critser, W. H. Eyestone, N. L. // Theriogenology. — 1986. — Vol. 25. — P. 591–600.
16. Rozenkrans C. F. First Effect of free amino acids and vitamins on cleavage and developmental rate of bovine zygotes in vitro / C. F. Rozenkrans, N. L. // J. Anim. Science. — 1994. — Vol. 72. — P. 434–437.
17. Conti M. Role of the epidermal growth factor network in ovarian follicles / M. Conti, M. Hsieh, J. Y. Park, Y. Q. Su // Mol. Endocrinol. — 2006. — Vol. 20. — P. 715–723.