

**Репродуктивные биотехнологии**

УДК 636.2:591.391.1:57.085.23

doi: 10.15389/agrobiology.2021.6.1148rus

**ВЛИЯНИЕ ПРОЛАКТИНА НА КАЧЕСТВО ООЦИТОВ,  
ПОЛУЧЕННЫХ МЕТОДОМ ТРАНСВАГИНАЛЬНОЙ ПУНКЦИИ  
ФОЛЛИКУЛОВ ТЕЛОК\***Г.Н. СИНГИНА , Р.Ю. ЧИНАРОВ, В.А. ЛУКАНИНА, Т.А. ВОРОЖБИТ

Как в молочном, так и в мясном скотоводстве актуально получение как можно большего числа потомков от лучших матерей с целью повышения степени реализации их генетического потенциала в последующих поколениях. Решить эту задачу позволяет разработка и внедрение в практику технологии получения эмбрионов *in vitro* (*in vitro embryo production, IVP*) с использованием яйцеклеток от живых животных посредством трансвагинальной пункции фолликулов (*ovum-pick-up, OPU*). Важный этап технологии *IVP* — экстракорпоральное созревание ооцитов, моделированием которого можно существенно повысить ее эффективность. В настоящей работе мы впервые выявили положительное действие гипофизарного гормона пролактина на качество донорских *OPU*-ооцитов коров в процессе их созревания *in vitro*. Цель работы заключалась в оценке влияния пролактина на завершение ядерного созревания ооцитами, полученными методом трансвагинальной аспирации фолликулов, а также на развитие и качество эмбрионов, полученных после *in vitro* оплодотворения донорских ооцитов. Донорами ооцитов были половозрелые телки симментальской породы в возрасте от 19 до 25 мес ( $n = 4$ ) с естественным половым циклом. Трансвагинальную аспирацию фолликулов проводили каждые 4 сут с использованием системы *OPU* для крупного рогатого скота («Minitube», Германия). Всего было проведено 28 сессий *OPU*. Выделенные ооцит-кумулясные комплексы (*ОКК*) культивировали в среде *ТС-199*, дополненной 10 % фетальной бычьей сыворотки, 10 мкг/мл фолликулостимулирующего (*ФСГ*) и 10 мкг/мл лютеинизирующего (*ЛГ*) гормонов в отсутствие (контроль) или присутствии пролактина (*ПРЛ*) (опыт). Через 24 ч созревшие ооциты оплодотворяли для оценки компетенции к эмбриональному развитию. На 2-е сут после оплодотворения оценивали раздробившиеся зиготы, на 7-е сут определяли число эмбрионов, развившихся до стадии бластоцисты. Полученные на 7-е сут эмбрионы также фиксировали и окрашивали *DAPI* для оценки локализации ядер. Морфологический анализ не выявил влияния условий культивирования на завершение ядерного созревания. Доля созревших ооцитов была сходной в обеих группах и составляла в контроле и опытной группе соответственно 82,8 и 88,9 %. В то же время доля раздробившихся ооцитов после оплодотворения *in vitro* при их созревании в контроле была ниже ( $69,7 \pm 2,4$  %), чем в присутствии *ПРЛ* ( $81,7 \pm 4,9$  %) ( $p < 0,05$ ). Также обнаружено положительное влияние гормона на развитие созревших ооцитов до стадии бластоцисты. При культивировании *ОКК* в контрольной среде выход бластоцист составлял  $11,0 \pm 1,8$  %. Введение *ПРЛ* в среду *IVM* повышало этот показатель до  $17,2 \pm 2,0$  % ( $p < 0,05$ ). При этом не было обнаружено значимых различий между сравниваемыми вариантами по общему числу ядер в бластоцистах. Таким образом, пролактин в среде созревания оказывает стимулирующее действие на компетентность донорских ооцитов к последующему эмбриональному развитию. Позитивное влияние отмечается на стадии первого деления дробления и сохраняется до стадии бластоцисты, что свидетельствует о положительном действии гормона на качество ооцитов, а также о возможности его использования на этапе экстракорпорального созревания для повышения эффективности технологии *IVP*.

**Ключевые слова:** крупный рогатый скот, трансвагинальная пункция фолликулов, созревание ооцитов *in vitro*, пролактин, эмбриональное развитие.

Как в молочном, так и в мясном скотоводстве актуальной остается задача получения как можно большего количества потомков от лучших матерей с целью повышения степени реализации их генетического потенциала в последующих поколениях. Решить эту задачу позволяет разработка и внедрение в практику технологии получения эмбрионов *in vitro* (*in vitro embryo production, IVP*) с использованием яйцеклеток от живых животных посредством трансвагинальной пункции фолликулов (*ovum-pick-up, OPU*) (1, 2). Показано, что *OPU* — наиболее гибкий и воспроизводимый метод получения эмбрионов от живых доноров. В отличие от множественной овуляции и трансплантации эмбрионов, *OPU* не препятствует нормальному

\* Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (проект 20-316-90003) и Министерства науки и высшего образования РФ.

воспроизводству и производственному циклу донора. Подходящим донором может стать любая самка в возрасте от 6 мес до 3-го мес стельности и вскоре после отела (через 2-3 нед) (2). В настоящее время ОРУ стала реализованной на практике альтернативой традиционной программе получения эмбрионов *in vivo* (3, 4) и все чаще используется в коммерческих целях во всем мире (5-7).

Как известно, эффективность ИVP технологии определяется не только качеством исходной популяции гамет, выделенных из яичников животных (8, 9), но и условиями среды, окружающей ооциты *in vitro* (10, 11). Наиболее важный этап культивирования — это созревание ооцитов. Посредством его моделирования можно существенно повысить как количественные (доля эмбрионов на стадии бластоцисты), так и качественные (полноценность бластоцист) показатели эффективности ИVP метода (12). Подавляющее большинство современных исследований ориентировано в первую очередь на поиск физиологически уместных веществ (факторов роста, гормонов, стероидов, жирных кислот, аминокислот, метаболитов), способных специфически воздействовать на ооциты, повышая или поддерживая их жизнеспособность и компетенцию к развитию, а также на идентификацию механизмов такого влияния (13-16).

К настоящему времени установлено, что гормон гипофиза пролактин (ПРЛ) влияет на овариальную функцию самок и может позитивно модулировать созревание ооцитов и их способность к эмбриональному развитию (17-20). Рецепторы этого гормона или его мРНК выявлены в ооцитах и сопряженных с ними клетках кумулюса у различных видов млекопитающих, включая коров (20-23). В условиях *in vitro* добавление ПРЛ к среде созревания *post mortem* ооцитов коров положительно влияет на ядерное созревание и качество яйцеклеток, а также повышает их компетенцию к дальнейшему эмбриональному развитию (20, 24, 25). На модели пролонгированного культивирования ооцитов этого вида показано, что ПРЛ тормозит деструктивные изменения морфологии метафазных хромосом и снижает частоту апоптотической дегенерации стареющих ооцитов (26, 27). Кроме того, пролактин повышает компетенцию зрелых ооцитов к дальнейшему эмбриональному развитию, снижающуюся в процессе старения (27). В целом пролактин можно рассматривать как потенциальный регулятор качества женских половых клеток и использовать для повышения их полноценности в условиях *in vitro*.

В настоящей работе мы впервые выявили положительное действие гипофизарного гормона пролактина на качество донорских ОРУ-ооцитов коров в процессе их созревания *in vitro*.

Цель работы заключалась в оценке влияния пролактина на завершение ядерного созревания ооцитами, полученными методом трансвагинальной пункции фолликулов, а также на развитие и качество эмбрионов после *in vitro* оплодотворения донорских ооцитов.

**Методика.** Во всех экспериментах, кроме отдельно указанных случаев, были использованы реагенты фирмы «Sigma-Aldrich» (США).

Ооциты получали от половозрелых телок (*Bos taurus taurus*) симментальской породы в возрасте от 19 до 25 мес ( $n = 4$ ) с естественным половым циклом. Пункцию фолликулов выполняли каждые 4 сут с использованием ОРУ-системы для крупного рогатого скота («Minitube», Германия), включающей ультразвуковой сканер SSD Pro Sound 2, конвекционный секторный зонд, вакуумный насос и держатель зонда. Аспирацию всех видимых фолликулов проводили иглой диаметром 1,2 мм и длиной 75 мм, соединенной силиконовым шлангом с флаконом объемом 50 мл. В качестве

аспирационной жидкости использовали фосфатно-солевой буфер (ФСБ) с добавлением 10 % фетальной бычьей сыворотки (ФБС), 18 МЕ/мл гепарина и 50 мг/мл гентамицина. Аспираты от каждого донора фильтровали индивидуально, промывали с использованием ФСБ, дополненного 1 % ФБС, после чего под стереомикроскопом («Nikon», Япония) искали и оценивали ооцит-кумуляусные комплексы (ОКК). Выделенные ОКК разделяли на пригодные для культивирования *in vitro* (включая ооциты, лишенные клеток кумулюса) и не пригодные для культивирования *in vitro* (с явными цитоплазматическими аномалиями). Отобранные ОКК в течение 24 ч инкубировали с целью созревания в среде ТС-199, дополненной 10 % ФБС, 10 мкг/мл фолликулостимулирующего (ФСГ) и 10 мкг/мл лютеинизирующего (ЛГ) гормонов в отсутствие (контроль) или присутствии ПРЛ (50 нг/мл) (опыт).

Созревшие ооциты подвергали оплодотворению для оценки компетенции к эмбриональному развитию. ОКК однократно промывали в среде оплодотворения ВО-IVF («IVF Bioscience», Великобритания) и помещали в капли той же среды за 30 мин до контакта со сперматозоидами.

Ооциты оплодотворяли с использованием заморожено-оттаянной спермы одного быка симментальской породы. Для этого за 1,5 ч до оплодотворения соломинки с замороженной спермой размораживали, активные сперматозоиды получали методом swim-up (28) с использованием среды Sperm-TALP, содержащей 1 мМ пирувата натрия, 6 мг/мл БСА (27). Содержимое соломинок подслаивали по 220 мкл в 1,8 мл пробирки («Nunc», Дания), содержащие 1 мл среды Sperm-TALP, и помещали в инкубатор (МСО-18AIC, «Sanyo», Япония) на 50 мин. В конце инкубации из пробирок отбирали 750 мкл верхнего слоя с его последующим разбавлением свежей средой и центрифугированием (центрифуга 3-30KS, «Sigma», Германия) при 300 g в течение 7 мин. Полученный осадок, содержащий подвижные спермии, вносили в среду оплодотворения (ВО-IVF) с предварительно перенесенными туда ОКК до конечной концентрации  $1,5 \times 10^6$  сперматозоидов на 1 мл.

Созревание и оплодотворение ОКК происходило в 4-луночных планшетах («Биомедикал», Россия) в каплях среды объемом 90 мкл, полностью покрытой легким минеральным маслом.

Через 16-18 ч совместной инкубации со спермой ооциты осторожно пипетировали и отмывали в среде CR1aa (29) для освобождения от клеток кумулюса и налипших сперматозоидов. Одновременно с промывом проводили морфологическую оценку изолированных ооцитов, подсчитывая число яйцеклеток с направлятельными тельцами (первым или первым и вторым) и определяя процент созревания. Предполагаемые зиготы (вне зависимости от наличия или отсутствия полярных телец) переносили в среду CR1aa и культивировали в течение 4,5 сут, после чего развивающиеся эмбрионы помещали в ту же среду, содержащую 5 % ФБС.

Эмбрионы развивались в 4-луночных планшетах («Nunc», Дания) в 90 мкл среды, полностью покрытой легким минеральным маслом. На 2-е сут после оплодотворения ооцитов проводили морфологическую оценку раздробившихся зигот, на 7-е сут определяли число эмбрионов, развившихся до стадии бластоцисты. Оценку выполняли под стереомикроскопом SMZ («Nikon», Япония) при увеличении  $\times 40-60$ .

Созревание и оплодотворение ооцитов, а также культивирование эмбрионов происходило при температуре 38,5 °C в атмосфере с 5 % CO<sub>2</sub> при 90 % влажности.

Полученные на 7-е сут эмбрионы фиксировали 4 % раствором параформальдегида (60 мин), пермеабелизировали в 0,1 % растворе цитрата натрия, содержащем 0,5 % Тритона X-100 (30 мин) и окрашивали DAPI с

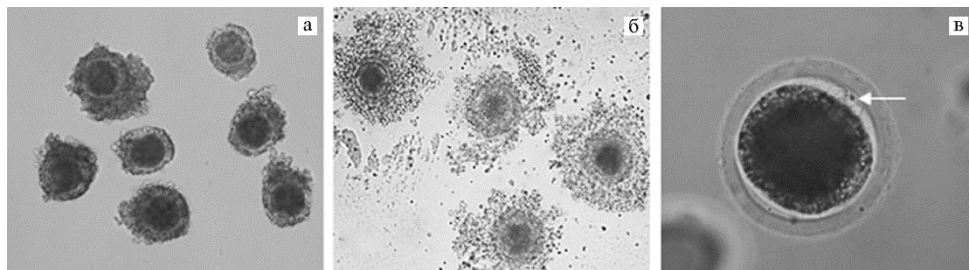
целью локализации ядер (20 мин). Обработанные таким образом эмбрионы переносили на предметное стекло и заключали в среду Vectashield («Vector Laboratories», Великобритания). Микрофотографирование и оценку препаратов выполняли под микроскопом Axio Imager.M2 («Carl Zeiss», Германия) с использованием программы ZEN 2 pro («Carl Zeiss», Германия).

Статистическую обработку данных проводили методом однофакторного дисперсионного анализа в программе SigmaStat («Systat Software, Inc.», США). Данные выражали как средние значения ( $M$ ) и стандартные ошибки средних ( $\pm SEM$ ). Достоверность различий сравниваемых средних значений оценивали с использованием критерия Тьюки.

*Результаты.* К настоящему времени достигнут существенный прогресс в разработке IVP технологии у крупного рогатого скота с использованием донорских ооцитов, однако полноценность эмбрионов, развившихся *in vitro* из OPU-ооцитов, по-прежнему остается значительно более низкой, чем развившихся *in vivo* (5–8). Идентификация биологически уместных факторов, отвечающих за регуляцию качества ооцитов в период их созревания *in vitro*, будет способствовать решению этой проблемы (12–13, 16).

Поскольку ПРЛ позитивно модулирует созревание *post mortem* ооцитов коров и их способность к эмбриональному развитию (20, 24, 25), есть вероятность, что аналогичным образом этот гормон может влиять и на донорские ооциты. В настоящей работе ооциты, полученные методом трансвагинальной аспирации фолликулов, культивировали в присутствии или отсутствии ПРЛ (50 нг/мл), после чего оплодотворяли *in vitro* и культивировали до стадии бластоцисты. Оценивали влияние ПРЛ на завершение ядерного созревания OPU-ооцитами, а также на развитие и качество IVP эмбрионов.

Всего у четырех телок симментальской породы за 28 сессий OPU было аспирировано 360 фолликулов, из которых выделено 166 ОКК. Число ооцитов, выделенных от индивидуальных доноров (1 сессия OPU), составило в среднем 5,9 ооцита. ОКК (рис. 1, а) полученные в процессе OPU, за исключением ооцитов с явными аномалиями цитоплазмы (всего 140 ОКК, 5,0 на 1 сессию OPU), культивировали в среде IVМ до завершения созревания (см. рис. 1, б) в отсутствие (контроль) либо в присутствии ПРЛ.



**Рис. 1.** Микрофотографии ооцитов телок симментальской породы, полученных методом трансвагинальной пункции фолликулов: а — незрелые ооцит-кумулюсные комплексы (увеличение  $\times 100$ ), б — ооцит-кумулюсные комплексы после 24 ч созревания *in vitro* (увеличение  $\times 100$ ), в — созревшие ооциты после процедуры оплодотворения *in vitro* (белой стрелкой обозначены полярные тельца, увеличение  $\times 400$ ) (микроскоп Eclipse Ti-U, «Nikon», Япония).

Морфологический анализ не обнаружил влияния пролактина на завершение ядерного созревания. Доля созревших ооцитов как отношение числа ооцитов с полярными тельцами (см. рис. 1, в) к исходному числу, определяемое после процедуры IVF в процессе освобождения яйцеклеток от кумулюсных клеток и сперматозоидов, была высокой и существенно не

различалась между контрольной и опытной группами (табл. 1).

**1. Способность ооцитов, полученных методом трансвагинальной пункции фолликулов телок симментальской породы и созревающих в присутствии пролактина, к эмбриональному развитию после оплодотворения в условиях *in vitro* ( $M \pm SEM$ )**

Группа	Число ооцитов, <i>n</i>	Доля созревших ооцитов, <i>n</i>	Доля раздробившихся ооцитов, %	Доля ооцитов, развившихся до стадии бластоцисты, %
Контроль	80	82,8±3,8	69,7±2,4	11,0±1,8
Опыт	60	88,9±3,9	81,7±4,9*	17,2±2,0*

Примечание. Описание групп см. в разделе «Методика».

\* Различия между сравниваемыми группами статистически значимы при  $p < 0,05$ .

Компетенцию зрелых ооцитов к развитию после оплодотворения *in vitro* оценивали по их способности вступать в первое деление дробления (рис. 2, а) и достигать стадии бластоцисты (см. рис. 2, б, табл. 1). Доля раздробившихся ооцитов после оплодотворения *in vitro* на 2-е сут культивирования в контроле была ниже, чем в опыте ( $p < 0,05$ ). Также обнаружено положительное влияние гормона на развитие созревших ооцитов до стадии бластоцисты (см. табл. 1). В целом количество бластоцист на одну сессию ОРУ в опытной группе было выше, чем в контроле, в 1,5 раза (табл. 2).

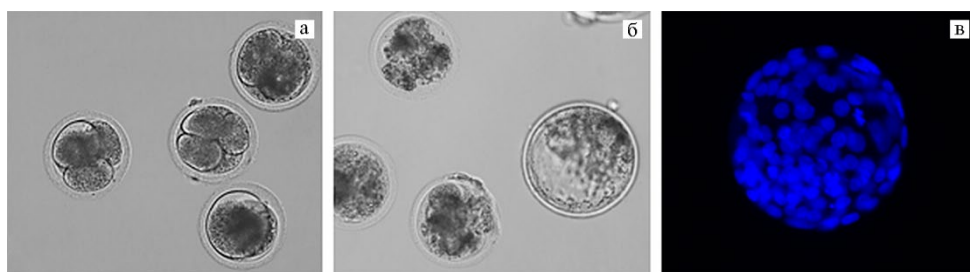


Рис. 2. Микрофотографии эмбрионов крупного рогатого скота симментальской породы, развившихся после *in vitro* оплодотворения донорских ооцитов, полученных методом трансвагинальной аспирации фолликулов: а — раздробившиеся ооциты (увеличение  $\times 200$ ), б — эмбрионы, развившиеся до стадии бластоцисты (увеличение  $\times 100$ ) (микроскоп Eclipse Ti-U, «Nikon», Япония); в — окраска ядер в бластоцисте с помощью DAPI (синий цвет), цитологический препарат (увеличение  $\times 400$ ) (микроскоп Axio Imager.M2, «Carl Zeiss», Германия).

Использование пролактина существенно не изменяло качество IVP эмбрионов, которое оценивали по числу ядер на 7-е сут после оплодотворения (см. рис. 2, в), однако при созревании ОРУ-ооцитов в присутствии ПРЛ наблюдалась тенденция к увеличению этого показателя (табл. 2).

**2. Эффективность IVP (*in vitro* embryo production) технологии и качество IVP эмбрионов при выращивании ооцитов, полученных методом трансвагинальной аспирации фолликулов телок симментальской породы, в присутствии пролактина ( $M \pm SEM$ )**

Группа	Число сессий ОРУ, <i>n</i>	Всего эмбрионов на стадии бластоцисты, <i>n</i>	Число бластоцист на одну сессию ОРУ, <i>n</i>	Число ядер в бластоцисте, <i>n</i>
Контроль	16	9	0,59±0,11	67,3±3,0
Опыт	12	10	0,86±0,09	78,6±5,2

Примечание. ОРУ — ovum-pick-up. Описание групп см. в разделе «Методика».

О стимулирующем действии ПРЛ в период IVМ на дальнейшее развитие оплодотворенных яйцеклеток до стадии бластоцисты сообщалось ранее для ооцитов кроликов и мышей (30, 19). Также сходный эффект ПРЛ наблюдали при совместном культивировании *post mortem* ОКК коров с клетками гранулезы (25) и в присутствии гонадотропных гормонов (20). В последнем случае внесение пролактина в среду культивирования ОКК, со-

держашую ФСГ и ЛГ, приводило к повышению выхода эмбрионов от общего числа оплодотворенных *in vitro* ооцитов, 2-кратному повышению выхода бластоцист и увеличению среднего числа ядер на одну бластоцисту. В нашем исследовании внесение ПРЛ в среду ИVM с ФСГ и ЛГ хоть и имело сходный эффект на их компетенцию к развитию *in vitro*, но не обеспечивало столь существенного выхода бластоцист и статистически значимого изменения в количестве их ядерного материала.

Как известно, клетки кумулюса участвуют в поддержании нормальных процессов созревания и оплодотворения ооцитов млекопитающих (31). Кроме того, их присутствие необходимо для реализации описанного выше положительного эффекта ПРЛ в отношении эмбрионального развития *post mortem* ооцитов (20). В отличие от донорских ооцитов, последние перед культивированием *in vitro* проходят тщательный отбор по морфологическим признакам, в частности по наличию компактного многослойного кумулюса. В нашей работе для культивирования были использованы не только морфологически нормальные ОКК, но и ооциты, частично окруженные клетками кумулюса, а также практически лишенные клеток кумулюса. Особенности отбора, возможно, повлияли на характер выявленного позитивного эффекта исследуемого гормона.

Таким образом, гормон гипофиза пролактин в среде созревания оказывает стимулирующее влияние на компетентность донорских ооцитов крупного рогатого скота, полученных методом трансвагинальной пункции фолликулов, к последующему эмбриональному развитию. Позитивное влияние проявляется на стадии первого деления дробления и сохраняется в процессе развития эмбрионов до стадии бластоцисты, что свидетельствует о положительном действии гормона на качество ооцитов, а также о возможности его использования на этапе экстракорпорального созревания для повышения эффективности технологии IVP (*in vitro* embryo production).

## ЛИТЕРАТУРА

1. Boni R. Ovum pick-up in cattle: a 25 years retrospective analysis. *Animal Reproduction*, 2012, 9(3): 362-369.
2. Qi M., Yao Y., Ma H., Wang J., Zhao X., Liu L., Tang X., Zhang L., Zhang S., Sun F. Transvaginal ultrasound-guided ovum pick-up (OPU) in cattle. *Journal of Biomimetics Biomaterials and Tissue Engineering*, 2013, 18: 118.
3. Sanches B.V., Zangirolamo A.F., Seneda M.M. Intensive use of IVF by large-scale dairy programs. *Animal Reproduction*, 2019, 16(3): 394-401 (doi: 10.21451/1984-3143-AR2019-0058).
4. Viana J. 2019 Statistics of embryo production and transfer in domestic farm animals. *Embryo Technology Newsletter*, 2020, 38(4): 7-26.
5. Sirard M.A. 40 years of bovine IVF in the new genomic selection context. *Reproduction*, 2018, 156(1): R1-R7 (doi: 10.1530/REP-18-0008).
6. van Wagtenonck-de Leeuw A.M. Ovum pick up and *in vitro* production in the bovine after use in several generations: a 2005 status. *Theriogenology*, 2006, 65(5): 914-925 (doi: 10.1016/j.theriogenology.2005.09.007).
7. Baldassarre H., Bordignon V. Laparoscopic ovum pick-up for *in vitro* embryo production from dairy bovine and buffalo calves. *Animal Reproduction*, 2018, 15(3): 191-196 (doi: 10.21451/1984-3143-AR2018-0057).
8. Aguila L., Treulen F., Therrien J., Felmer R., Valdivia M., Smith L.C. Oocyte selection for *in vitro* embryo production in bovine species: noninvasive approaches for new challenges of oocyte competence. *Animals*, 2020, 10(12): 2196 (doi: 10.3390/ani10122196).
9. Saini N., Singh M.K., Shah S.M., Singh K.P., Kaushik R., Manik R.S., Singla S.K., Palta P., Chauhan M.S. Developmental competence of different quality bovine oocytes retrieved through ovum pick-up following *in vitro* maturation and fertilization. *Animal*, 2015, 9(12): 1979-85 (doi: 10.1017/S1751731115001226).
10. Stroebech L., Mazzoni G., Pedersen H.S., Freude K.K., Kadarmideen H.N., Callesen H., Hyttel P. *In vitro* production of bovine embryos: revisiting oocyte development and application of systems biology. *Animal Reproduction*, 2015, 12(3): 465-472.

11. Gilchrist R.B., Thompson J.G. Oocyte maturation: emerging concepts and technologies to improve developmental potential in vitro. *Theriogenology*, 2007, 67(1): 6-15 (doi: 10.1016/j.theriogenology.2006.09.027).
12. Blanco M.R., Demyda S., Moreno Millán M., Genero E. Developmental competence of in vivo and in vitro matured oocytes: a review. *Biotechnology and Molecular Biology Reviews*, 2011, 6(7): 155-165 (doi: 10.5897/BMBR2011.0015).
13. Lonergan P., Fair T., Forde N., Rizos D. Embryo development in dairy cattle. *Theriogenology*, 2016, 86(1): 270-277 (doi: 10.1016/j.theriogenology.2016.04.040).
14. Lonergan P., Fair T. Maturation of oocytes in vitro. *Annual Review of Animal Biosciences*, 2016, 4: 255-268 (doi: 10.1146/annurev-animal-022114-110822).
15. Abd El-Aziz A.H., Mahrous U.E., Kamel S.Z., Sabek A.A. Factors influencing in vitro production of bovine embryos: a review. *Asian Journal of Animal and Veterinary Advances*, 2016, 11(12): 737-756 (doi: 10.3923/ajava.2016.737.756).
16. Ferré L.B., Kjelland M.E., Stråbech L.B., Hyttel P., Mermillod P., Ross P.J. Review: Recent advances in bovine in vitro embryo production: reproductive biotechnology history and methods. *Animal*, 2020, 14(5): 991-1004 (doi: 10.1017/S1751731119002775).
17. Wise T., Suss U., Stranzinger G., Wuthrich K., Maurer R.R. Cumulus and oocyte maturation and in vitro and in vivo fertilization of oocytes in relation to follicular steroids, prolactin, and glycosaminoglycans throughout the estrous period in superovulated heifers with a normal LH surge, no detectable LH surge, and progesterin inhibition of LH surge. *Domestic Animal Endocrinology*, 1994, 11(1): 59-86 (doi: 10.1016/0739-7240(94)90036-1).
18. Jinno M., Katsumata Y., Hoshiai T., Nakamura Y., Matsumoto K., Yoshimura Y. A therapeutic role of prolactin supplementation in ovarian stimulation for in vitro fertilization: the bromocriptine-rebound method. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 1997, 82(11): 3603-3611 (doi: 10.1210/jcem.82.11.4349).
19. Bole-Feysot C., Goffin V., Edery M., Binart N., Kelly P.A. Prolactin (PRL) and its receptor: actions, signal transduction pathways and phenotypes observed in PRL receptor knockout mice. *Endocrine Reviews*, 1998, 19(3): 225-268 (doi: 10.1210/edrv.19.3.0334).
20. Lebedeva I.Y., Singina G.N., Volkova N.A., Vejlsted M., Zinovieva N.A., Schmidt M. Prolactin affects bovine oocytes through direct and cumulus-mediated pathways. *Theriogenology*, 2014, 82(8): 1154-1164.e1 (doi: 10.1016/j.theriogenology.2014.08.005).
21. Picazo R.A., García Ruiz J.P., Santiago Moreno J., González de Bulnes A., Muñoz J., Silván G., Lorenzo P.L., Illera J.C. Cellular localization and changes in expression of prolactin receptor isoforms in sheep ovary throughout the estrous cycle. *Reproduction*, 2004, 128(5): 545-553 (doi: 10.1530/rep.1.00343).
22. Nakamura E., Otsuka F., Inagaki K., Miyoshi T., Yamanaka R., Tsukamoto N., Suzuki J., Ogura T., Makino H. A novel antagonistic effect of the bone morphogenetic protein system on prolactin actions in regulating steroidogenesis by granulosa cells. *Endocrinology*, 2010, 151(11): 5506-5518 (doi: 10.1210/en.2010-0265).
23. Kiapekou E., Loutradis D., Patsoula E., Koussidis G.A., Minas V., Bletsas R., Antsaklis A., Michalas S., Makrigiannakis A. Prolactin receptor mRNA expression in oocytes and preimplantation mouse embryos. *Reproductive BioMedicine Online*, 2005, 10(3): 339-346 (doi: 10.1016/s1472-6483(10)61793-2).
24. Kuzmina T.I., Lebedeva I.Y., Torner H., Alm H., Denisenko V.Y. Effects of prolactin on intracellular stored calcium in the course of bovine oocyte maturation in vitro. *Theriogenology*, 1999, 51(7): 1363-1374 (doi: 10.1016/S0093-691X(99)00080-1).
25. Кузьмина Т.И., Лебедева И.Ю., Торнер Х., Альм Х. Эффекты пролактина в различных системах культивирования на созревание ооцитов коров и их способность к дальнейшему развитию. *Онтогенез*, 2001, 32(2): 140-147.
26. Lebedeva I.Y., Singina G.N., Lopukhov A.B., Shedova E.N., Zinovieva N.A. Prolactin and growth hormone affect metaphase II chromosomes in aging oocytes via cumulus cells using similar signaling pathways. *Frontiers in Genetics*, 2015, 6: 274 (doi: 10.3389/fgene.2015.00274).
27. Singina G.N., Shedova E.N., Lopukhov A.V., Mityashova O.S., Lebedeva I.Y. Delaying effects of prolactin and growth hormone on aging processes in bovine oocytes matured in vitro. *Pharmaceuticals*, 2021, 14(7): 684 (doi: 10.3390/ph14070684).
28. Parrish J.J., Susko-Parrish J.L., Leibfried-Rutledge M.L., Critser E.S., Eyestone W.H., First N.L. Bovine in vitro fertilization with frozen-thawed semen. *Theriogenology*, 1986, 25(4): 591-600 (doi: 10.1016/0093-691X(86)90143-3).
29. Rosenkrans C.F. Jr., First N.L. Effect of free amino acids and vitamins on cleavage and developmental rate of bovine zygotes in vitro. *Journal of Animal Science*, 1994, 72(2): 434-437 (doi: 10.2527/1994.722434x).
30. Yoshimura Y., Hosoi Y., Iritani A., Nakamura Y., Atlas S.J., Wallach E.E. Developmental potential of rabbit oocytes matured in vitro: the possible contribution of prolactin. *Biology of Reproduction*, 1989, 41(1): 26-33 (doi: 10.1095/BIOLREPROD41.1.26).

31. Tanghe S., Van Soom A., Nauwynck H., Coryn M., de Kruif A. Minireview: functions of the cumulus oophorus during oocyte maturation, ovulation, and fertilization. *Molecular Reproduction and Development*, 2002, 61(3): 414-424 (doi: 10.1002/mrd.10102).

ФГБНУ ФИЦ животноводства —

ВИЖ им. академика Л.К. Эрнста,

142132 Россия, Московская обл., г.о. Подольск, пос. Дубровицы, 60,

e-mail: g\_singina@mail.ru ✉, roman\_chinarov@mail.ru, kris-

tibatle@gmail.com, tima\_voron2008@mail.ru

Поступила в редакцию

5 октября 2021 года

*Sel'skokhozyaystvennaya biologiya [Agricultural Biology]*, 2021, V. 56, № 6, pp. 1148-1155

## THE EFFECT OF PROLACTIN ON THE QUALITY OF HEIFER OOCYTES RETRIEVED BY TRANSVAGINAL PUNCTURE OF FOLLICLES

G.N. Singina ✉, R.Yu. Chinarov, V.A. Lukanina, T.A. Voroshbit

Ernst Federal Science Center for Animal Husbandry, 60, pos. Dubrovitsy, Podolsk District, Moscow Province, 142132 Russia, e-mail g\_singina@mail.ru (✉ corresponding author), roman\_chinarov@mail.ru, kristybatle@gmail.com, tima\_voron2008@mail.ru

ORCID:

Singina G.N. [orcid.org/0000-0003-0198-9757](https://orcid.org/0000-0003-0198-9757)

Lukanina V.A. [orcid.org/0000-0003-4744-7873](https://orcid.org/0000-0003-4744-7873)

Chinarov R.Yu. [orcid.org/0000-0001-6511-5341](https://orcid.org/0000-0001-6511-5341)

Voroshbit T.A. [orcid.org/0000-0002-2490-7489](https://orcid.org/0000-0002-2490-7489)

The authors declare no conflict of interests

Acknowledgements:

Supported financially by the Russian Foundation for Basic Research (project 20-316-90003) and the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation

Received October 5, 2021

doi: 10.15389/agrobiol.2021.6.1148eng

### Abstract

In both dairy and beef cattle breeding, producing the larger number of the offspring from the best mothers to increase the degree of genetic progress through the generations is of particular interests. One of the attractive ways to resolve this problem is the development and implementation of the technology for obtaining embryos in vitro (in vitro embryo production, IVP) using oocytes derived from live animals by transvaginal puncture of follicles — Ovum-Pick-Up (OPU). The extracorporeal maturation of oocytes is an important element of this technology that may significantly affect its efficiency. In this paper, for the first time, we evaluated the advantage of the pituitary hormone prolactin (PRL) — a potential regulator of the quality of mammalian oocytes, during the maturation of OPU-oocytes. The effect of this hormone on the completion of nuclear maturation of the OPU-oocytes, as well as on the development and quality of IVP embryos, was studied. The mature Simmental heifers at the age from 19 to 25 months ( $n = 4$ ) with a natural sexual cycle were used as the oocyte donors. Transvaginal aspiration of the follicles was performed every 4 days using the OPU system for cattle (Minitube, Germany). A total of 28 OPU sessions were carried out. The derived cumulus-oocyte complexes (COCs) were cultured in TS-199 medium supplemented with 10 % bovine fetal serum, 10  $\mu\text{g/ml}$  of follicle-stimulating (FSH) and 10  $\mu\text{g/ml}$  of luteinizing (LH) hormones in the absence (control) or presence of PRL. After 24 hours, the mature oocytes were subjected to fertilization to assess their developmental competence. Morphological analysis did not reveal the effect of culture conditions on the completion of nuclear maturation. The rate of mature oocytes was similar in both groups and was 82.8 and 88.9 %, respectively, in the control and the PRL groups. However, the oocyte cleavage rate after in vitro fertilization in the control group was lower comparing to the PRL group ( $69.7 \pm 2.4$  % vs.  $81.7 \pm 4.9$  %,  $p < 0.05$ ). A positive effect of the PRL on the development of mature oocytes to the blastocyst stage was observed. When COCs were cultured in the control medium, the yield of blastocysts was  $11.0 \pm 1.8$  %, while the adding of PRL into the IVM medium increased this indicator to  $17.2 \pm 2.0$  % ( $p < 0.05$ ). However, we did not find significant differences among compared groups in the relation to the total number of nuclei in blastocysts. Thus, prolactin hormone in the maturation environment has a stimulating effect on the developmental competence of donor oocytes. The positive effect is observed at the stage of the first cleavage and maintained during the development of embryos to the blastocyst stage. Our data indicate the positive effect of prolactin on the quality of OPU-oocytes, that makes it reasonable the using this hormone at the maturation stage to increase the effectiveness of IVP technology.

Keywords: cattle, transvaginal aspiration of follicles, in vitro oocyte maturation, prolactin, embryonic development.