



Монгол хонины өндгөн эсийг *in vitro* орчинд үр тогтоосон дүн

П.Эрдэнэтогтох, С.Отгонжаргал, С.Ганбат*

Мал эмнэлгийн сургууль, ХААИС

* Холбоо баригч зохиогч: ganbat_vet@muls.edu.mn

ХУРААНГУЙ

Бид хонины өндгөн эсийг *in vitro* орчинд үр тогтооход атаксантин бодис хэрхэн нөлөөлөхийг судлав. Өндгөн эсийг 22 цагийн турш 500 ng/ml атаксантин (Ах) агуулсан болон агуулаагүй орчинд бойжуулж үр тогтоолыг хийв. Үр тогтсон хөврөлийн 39°C мульт-инкубаторт 7 хоног байлгаж бластоцист шат хүртэл нь өсгөвөрлөсний дараа тээгч хээлтэгчид шилжүүлэн суулгав.

Атаксантин агуулсан болон агуулаагүй орчинд үр тогтолтын үр дүн бодитой ялгаа байхгүй байв. Харин бластоцистийн шат хүртэл хөгжих үед атаксантин бүхий орчинд өсгөвөрлөсөн хөврөлийн хөгжил атаксингүй орчныхоос илүү байв ($P=0.06$). Энэ нь үр тогтсоны дараа хөврөлийн цаашдын хөгжилд атаксантин эерэг нөлөөтэй болохыг илэрхийлж байна. Монгол орны нөхцөлд анх удаа *in vitro* орчинд өсгөвөрлөсөн хөврөлийн гаралтай хурга гаргаж авав.

ТҮЛХҮҮР ҮГС: өндгөн эс, морул, бластоцист, хөврөл, антиоксидант

ОРШИЛ

Хонины өндгөн эсийг *in vitro* орчинд үр тогтоох (IVF) анхны туршилтыг 1986 онд Их Британийн Кембриджид их сургууль хийснийг мэдээлжээ [1]. Энэ цагаас хойш хонины нөхөн үржихүйн технологийн шинэ эрин үе эхэлсэн юм. Нөхөн үржихүйн энэ технологи нь гурван дараалсан үе шаттай явагддаг. Биеийн гадна (*in vitro*) орчинд өндгөн эсийг бойжуулах (*in vitro maturation*), үр тогтоох (*in vitro fertilization*), үр тогтсон хөврөл өсгөвөрлөх (*in vitro culture*) гэсэн дарааллаар хийгддэг. Энэхүү нөхөн үржихүйн технологийг нэн ховор болон генетикийн өндөр ач холбогдолтой хөхтөн амьтны үргүйдэл, генийн санг хадгалах, удамшлын сайжруулалтыг түргэсгэх зэрэгт өргөн хэрэглэх болжээ [2]. Нөгөөтгээгүүр нөхөн үржихүйн биотехнологийн энэ аргыг ирээдүйд хонины аж ахуйн үржлийг хурдасгах, үйлдвэрлэлийн үр ашгийг дээшлүүлэхэд чухал үүрэг гүйцэтгэнэ гэж эрдэмтэд үзэж байна.

Энэ технологи нь хонины аж ахуйд хэдий хурдацтай хөгжиж байгаа ч явц, үр дүн муу хэвээр байна. Хонинд үр тогтол дунджаар 50-80%, бластоцист хөгжил нь ердөө 20% - 40% байгаа нь 1996 онд мэдээлсэн үр дүнтэй ижил байна [3]. *In*

vivo орчинд бий болсон хөврөл амьдрах чадвар, тэсвэрийн хувьд харьцангуй сайн байгаа нь цаашид *in vitro* орчинд хөврөл үйлдвэрлэлийг улам хөгжүүлэх боломж, шаардлага байгааг харуулж байгаа юм. Өндгөн эсийн үр тогтолтын хувь нь орчны найрлага, өсгөвөрлөх хугацаа, амьтны төрөл зүйл, нас, өндгөвчний уутанцарын хэмжээ зэрэг олон хүчин зүйлийн нөлөөнөөс болдог байна. Сүүлийн үед *in vitro* хөврөл үйлдвэрлэлийг сайжруулахын тулд антиоксидант бодисыг өргөн хэрэглэж байна. Антиоксидант бодист витамин С, витамин Е, β-каротин зэргийг өргөн хэрэглэж байгаа бөгөөд сүүлийн үед Атаксантиныг (Ах) [4] хавч хэлбэртэн, сам хорхой, хулд загас зэрэг улаан өнгийн пигмент агуулсан далайн амьтнаас гарган авдаг каротиногенүүд юм [5]. Атаксантин гахайн болон үнээний өндгөн эс болон хөврөлийн хөгжилд сайн үр дүн үзүүлсэн талаар мэдээлсэн [6] хэдий ч хонинд өндгөн эсийг өсгөвөрлөхөд хэрхэн нөлөөлдөг талаар мэдээлээгүй байна. Тиймээс бид энэхүү судалгаагаар *in vitro* орчинд хонины өндгөн эс өсгөвөрлөхөд болон хөврөлийн хөгжилд атаксантин хэрхэн нөлөөлдгийг харьцуулан судалсан болно.

МАТЕРИАЛ АРГА ЗҮЙ

Энэхүү судалгаанд бид Сигма-Алдричийн (АНУ-ын St. Louis, MO) химийн бодисуудыг ашигласан. Мал нядалгааны газраас Нутгийн монгол хонины өндгөвч цуглуулж 20°C-д уутанд хийж дулаан алддаггүй савд хадгалан, 3-5 цагийн дотор лабораторид тээвэрлэн авчирсан. Өндгөвчийг физиологийн уусмалаар гурван удаа угаасний дараа (1-5 мм диаметрэй) уутанцараас өндгөн эсийг соруулж өндгөн эс өсгөвөрлөх TCM-199 (TCM-199; Thermo Fisher Scientific, Roskilde, Denmark) орчинд (pH 7.4) 37°C-т хийнэ. Өндгөн эсийн гадна талын цацраг титмийн бүрүүл бүрэн бүтэн, бор өнгөтэйг сонгож өсгөвөрлөнө [7]. Өндгөн эсийг бойжуулахдаа 50-мкл (10-15 өндгөн эс) өндгөн эс байрлуулж өсгөвөрлөв [8]. Өндгөн эсэд атаксантин хэрхэн нөлөөлөхийг судлахдаа (Ax) 500 нг/мл (840 нМ) нэмж 5%-ийн CO₂ агуулсан инкубаторт 39°C-д 24 цаг бойжуулав. Инкубаторт 39°C-д 24 цаг бойжуулав.

Хонины өндгөн эсийг *in vitro* орчинд үр тогтоох, өсгөвөрлөх (IVF-IVC)

In vitro орчинд үр тогтоох (IVF) болон хөврөл өсгөвөрлөх (IVC), судалгаанд бид ВО-IVF, ВО-SemenPrep, ВО-IVC (Bioscience, Cornwall, UK), гэсэн тусгай орчинг ашиглан хөврөлийн хөгжлийг судлав. 450 µl ВО-IVF үр тогтоох орчинг 4 үүртэй тавагт (Nunc 176740, Thermo Fisher Scientific) хийж *in vitro* орчинд үр тогтоохоос 1 цагийн өмнө 5%-ийн CO₂ агуулсан инкубаторт 39°C-д байлгав. Гүн хөлдөөсөн үрийг 37°C-ийн усан баннд 30 секунд гэсгээж 15мл хуруу шилэнд 4мл ВО-SemenPrep хамт хийж, 5 минутын турш (300 x g) эргэлтээр центрифугдэн. 50 мкл үр соруулж 450 мкл ВО-IVF орчинтой 4 үүрт тавганд хийнэ (эцсийн концентрац: 2 x 10⁶ сперм / мл), 20-30 өндгөн эсийг үр тогтоох уусмалд шилжүүлэв. Үр

СУДАЛГААНЫ АЖЛЫН ҮР ДҮН

Хонинд хийсэн судалгаагаар атаксантин нэмсэн орчинд өндгөн эсийг бойжуулж үр тогтооход 114 өндгөн эсээс 72% нь харин тухайн бодисыг нэмээгүй орчинд бойжуулсан нийт 117 өндгөн

тогтолтыг 5% CO₂ аргуулсан 39°C-ийн инкубаторт 22 цагт байлгав. Үр тогтсоны дараа 5 минут эгсрэгч дээр байлгаж цацраг титмийн бүрхүүлээс чөлөөлж хөврөл өсгөвөрлөх уусмалд хийв. 35мм петрийн тавганд ВО-IVC орчингоос 30 мкл орчин бэлтгэн парафин тосоор бэхжүүлэв. Өсгөвөрлөх уусмалд 20-30 хөврөл хийж 5% -ийн CO₂, 5% O₂, 90% N₂ агуулсан 39°C мульти-инкубаторт 2-7 хоног байлгаж хөврөлийн хуваагдал болон бластоцистийн хөгжлийн тодорхойлов. (IVF-ийн дараа 44-48 болон 168-170 цагуудад шалгана).

Хөврөл шилжүүлэн суулгах

In vitro орчинд өсгөвөрлөсөн хөврөлөөс шаардлага хангасан хөврөлийг сонгон авч 3-6 цагийн дотор хээлтэгчид шилжүүлэн суулгав. Тээгч хонио мэс ажилбарт бэлтгэн мэс заслын ширээнд бэхлэн, хэсэн газрын болон нэвчүүлэн мэдээ алдуулалт хийв. (новокайн / зайлазин). Дэлэнгээс 4-6 см урагш хэвлийн цагаан шугамын дагуу тууш зүсэлтийг 5-8 см зүсэв. Хэвлийн гадна талд савыг гаргаж ирэв. Савны эврийн аль талын өндгөвчинд нь шар бием хөгжиж тэр талд нь эврийн үзүүрээс 4 см зайд мохоо зүүгээр цоолон тусгай гуурсанд соруулсан хөврөлийг савны эвэрт шилжүүлэн суулгав. Дараа нь савны эврийг буцаан байрлуулж, шарханд оёдол тавив. 21 хоногийн дараа Япон улсын Honda үйлдвэрийн HS101 маркийн хэт авиан багаж ашиглан хээлийг тодорхойлов.

Статистикийн дүн шинжилгээ

Судалгаанд үр хөврөлийн хөгжлийг Student's *t*-тестийн аргаар шинжлэв. Бүх дүн шинжилгээг JMP Pro хувилбар 12.0.1 (SAS Institute, Cary, NC, USA) ашиглан гүйцэтгэсэн.

эсийн 73.3% нь үр тогтоож хоёр бластомертэй болсон байв. Үүнээс харвал үр тогтолтын хувьд хоёр бүлгийн өндгөн эсэд бодитой ялгаа гарсангүй. (Хүснэгт 1).

Хүснэгт 1.

Хонины хөврөлд астаксантин бодисын нөлөө

Астаксантин	Өндгөн эсийн тоо (давталт)	% Үр тогтолт	% Бластоцист 6-р өдөр	% Бластоцист 7-р өдөр*
+	114 (5)	72.0 ± 14.3	57.2 ± 16.5	64.1 ± 12.4
-	117 (5)	73.3 ± 15.5	49.6 ± 22.6	50.6 ± 19.5

means ± SD тодорхойлов

* 7 дахь өдөр бластоцист шатанд нь үр хөврөл шилжүүлэх ажиллагааг гүйцэтгэсэн.

Дараа нь бид бластоцистын шат хүртэл нь зургаан өдрийн турш астаксантинтай болон хяналтын(Ах-гүй)орчинд хөврөлөө өсгөвөрлөв. Астаксантин буюу 1-р бүлгийн нийт 114 өндгөн эсээс 57.2% нь бластоцист шат хүртэл хөгжсөн. Хяналтын 2-р бүлгийн 117 өндгөн эсийн 49.6% нь

бластоцист шат хүртэл хөгжив. Хөврөлийг 7 дахь өдөр хүртэл үргэлжлүүлэн өсгөвөрлөхөд астаксантин агуулсан орчинд өсгөвөрлөсөн хөврөлийн 64.1%, хяналтын хөврөлийн 50.6% нь хөгжсөн байна.

Хүснэгт 2.

In vitro орчин үр тогтоож, өсгөвөрлөсөн хөврөлийг тээгчид шилжүүлэн суулгасан дүн

	Ороо нь жигдэрсэн (n)	Хээл авсан хонь (n*/n)	Хээл авсан (%)
Хөврөл шилжүүлсэн хонь	7	2/1	42.8

n* - Ихэр хээлтэй

Бид ороог нь жигдрүүлсэн 7 тээгч хонинд тэлсэн бластоцист шат хүртэл хөгжсөн хөврөлөө 2 ба 3-аар ихэрлүүлэн шилжүүлэн суулгав. Хөврөл шилжүүлэн суулгасан тээгчийн сав, өндгөвчийг шалгахад 4 тээгч хонины саванд хөврөл хөгжөөгүй, цуцарсан гэж үзэв. Харин 3 тээгчид хээл авсан ба 3 ихэр, 2 ихэр, 1 хээлтэй хонь байв. Үүнээс харахад саванд суулгасан зарим хөврөл нь

цуцарч зарим хөврөл цааш хөгжсөн гэж үзлээ. Хөврөл хэвийн хөгжсөн 3 тээгч бүгд төллөсөн бөгөөд нийт шилжүүлэн суулгасан хониноос 42.8% нь хээл авсан байна. Хээл авалтын хувь бага байгаа нь техник ажиллагаа болон бусад олон зүйлсээс хамааралтай тул энэхүү технологийг илүү боловсронгуй болгож практик хэрэглээ болгох шаардлагатай байна.

ШҮҮН ХЭЛЭЛЦЭХҮЙ

Сайн чанарын хөврөл үйлдвэрлэхэд хамгийн түрүүн бүрэн гүйцэд хөгжсөн буюу туйлын биетэй, метафаз II шат хүртэл бойжсон өндгөн эсийг бэлтгэх явдал юм [9]. Ихэнх лабораториуд уламжлалт Tissue Culture Medium 199 (TCM199) өргөн хэрэглэхээс гадна өндгөн эсийг бойжуулахдаа стандарт болох 38.5 - 39°C, 5% CO₂ агуулсан инкубаторт 20-24 цаг байлгаж хөгжлийн гүйцээж байна [10]. Судлаачдын мэдээлснээр өндгөн эс MII шат хүрэх хугацаа нь 16-24 цаг байдаг ба энэ үеэс хойш өндгөн эс чанараа алдаж эхэлдэг байна [11]. Тиймээс бид өндгөн эсийн хөгжлийг бүрэн гүйцээх зорилгоор 24 цаг

өсгөвөрлөж үр тогтоолтыг хийсэн. Хонины өндгөн эсэд хийсэн судлаачдын судалгаагаар 22 цаг бойжуулсан өндгөн эсийн үр тогтолт 45-50% [12,13] байсан бол 24 цаг бойжуулахад дунджаар 70-80% байгаа талаар мэдээлсэн байдаг [10]. Харин хонины хөврөлийг *in vitro* орчинд үр тогтоож бластоцист шат хүртэл нь өсгөвөрлөхөд SOF орчинд өсгөвөрлөхөд 59.2%-тай байсан талаар мэдээлсэн байна [11,14]. Харин бидний Монгол хонинд хийсэн судалгаагаар астаксантин агуулсан орчинд 72%, агуулаагүй орчинд 73.3% үр тогтсон нь гадаадын судлаачдын мэдээлснээс харьцангуй өндөр байв. Гэвч үр дүнд ашигласан

үрийн чанар болон бусад олон хүчин зүйл нөлөөлж болох билээ.

Монгол хонинд хийсэн бидний туршилтаар энгийн орчинд хөврөлийн 50.6% нь, атаксантин нэмсэн орчинд 64.1%-нь бластоцист шат хүртлээ хөгжсөн байв. Энэ нь үр тогтолтын хувь бусад судлаачдын судалгааны үр дүнтэй дүйж байгаа хэдий ч бластоцистын хөгжил нь гадаадын судлаачдын үр дүнгээс өндөр байв. Бидний туршилтаар ашигласан ВО-IVM, ВО-IVF, ВО-IVC орчинд үр тогтоход үр тогтолтын хувь бусад орчноосоо харьцангуй өндөр байгаа нь цаашид энэхүү орчинг хэрэглэх нь илүү үр дүнтэй байх боломжтойг илэрхийлж байна.

Өндгөн эсийг өсгөвөрлөх температур нь (41°C), атаксантин 12.5 болон 25 nM хэмжээтэй уусмалд хийж өндгөн эсийг өсгөвөрлөхөд дулааны цочролоос үүсэх сөрөг нөлөө бага бластоцист шатанд хүрч сайн үр дүнтэй байсан бол 50nM атаксантин агуулсан үед эерэг нөлөө үзүүлдэггүй байна [15].

ДУГНЭЛТ

1. Атаксантин үр тогтолтод эерэг болон сөрөг нөлөөгүй үзүүлээгүй боловч хөврөлийн цаашдын хөгжилд сайнаар нөлөөлж байна.
2. Бэлчээрийн монгол хонины өндгөн эсийг ашиглан *in vitro* орчинд үр тогтоход бластоцистын хөгжил, хээлийн амилалт

Харин бидний судалгаагаар өндгөн эсийг 39°C -д, 840 nM (500 нг / мл) атаксантин агуулсан уусмалд өсгөвөрлөхөд хөврөлийн хөгжил сайн үр дүнтэй байгаа нь харагдаж байна. Эдгээр үр дүнгээс хархад атаксантин өөр өөр концентрацтай үед өндгөн эсийн хөгжилд үзүүлэх нөлөө өөр өөр байдгийг илэрхийлж байгаа учир амьтны өндгөн эсийг өсгөвөрлөхөд хамгийн тохирох атаксантиний концентрацыг судлах хэрэгтэй. Атаксантин өндгөн эс болон хөврөлийн хөгжилд сайнаар нөлөөлж байна. *In vitro* орчинд үр тогтоосон хөврөлийг тээгч хонинд шилжүүлэн суулгаж, хээл авалтыг мэдээлсэн М.С.Мах (4.3%), Wang.S (18.1%) болон бусад нэлээд судлаачдын [16] ажлын үр дүнгээс бидний ажлын дүн харьцангуй өндөр (42.8%) гарав. Энэ нь нэг талаас бидний хийсэн судалгаа харьцангуй цөөн (n=7) малыг хамарснаас магадлал багатай байж болох талтай хэдий ч нөгөө талаас нь авч үзвэл монгол малын биологийн онцлогтой холбоотой байж болох талтай.

- дундаж үзүүлэлтээс харьцангуй өндөр байгааг биологийн онцлогтой нь холбон үзэж байна.
3. Монгол орны нөхцөлд анх удаа *in vitro* орчинд өсгөвөрлөсөн хөврөлийн гаралтай хурга бойжуулав.

АШИГЛАСАН БҮТЭЭЛИЙН ЖАГСААЛТ

1. Cheng WTK, Moor RM, Polge CE. (1986), *In vitro* fertilization of pig and sheep oocytes matured in vivo and in vitro. *Theriogenology*, 25:14.
2. Rizos D, Clemente M, Bermejo-Alvarez P, Fuente J de La, Lonergan P, Gutierrez-Ada'n A.(2008), Consequences of In Vitro Culture Conditions on Embryo Development and Quality. *Reprod Dom Anim*;43(Suppl. 4):44–50
3. Walker SK, Hill JL, Kleemann DO, Nancarrow CD. (1996), Development of Ovine Embryos in Synthetic Oviductal Fluid Containing Amino Acids at Oviductal Fluid Concentrations. *Biol Reprod*;55:703–8.
4. Sovereign TC, Adona PR, Monzani PS, Guemra S, Barros FDA, Lopes FG, Leal CLV. (2017), Effects of supplementation of medium with different antioxidants during *in vitro* maturation of bovine oocytes on subsequent embryo production. *Reprod Domest Anim*.52, 561-569,
5. Kuraji M, Matsuno T, Satoh T. (2016). Astaxanthin affects oxidative stress and hyposalivation in aging mice. *J Clin Biochem Nutr* 59, 79-85,
6. Do LTK, Luu VV, Morita Y, Taniguchi M, Nii M, Peter AT, Otoi T. (2015), Astaxanthin present in the maturation medium reduces negative effects of heat shock on the developmental competence of porcine oocytes. *Reprod Biol* 15, 86-93,
7. Nagano, M., Katagiri, S., and Takahashi, Y. (2006), ATP content and maturational/developmental ability of bovine oocytes with various cytoplasmic morphologies. *Zygote* 14, 299-304
8. Nagano M, Katagiri S, Takahashi Y. (2006), Relationship between bovine oocyte morphology and *in vitro* developmental potential. *Zygote* 14, 53-61
9. Cognié Y, Baril G, Poulin N, Mermillod P. Current status of embryo technologies in sheep and goat. *Theriogenology* 2003;59(1):171–88. (a review).

10. Jie Zhua , Adel R. Moawadb , Chun-Yu Wanga , Hui-Feng Lia , Jing-Yu Rena , Yan-Feng Daia, (2018), Advances in in vitro production of sheep embryos International Journal of Veterinary Science and Medicine 6 S15–S26
11. Ledda S, Idda A, Kelly J, Ariu F, Bogliolo L, Bebbere D. (2016), A novel technique for in vitro maturation of sheep oocytes in a liquid marble microbioreactor. J Assist Reprod Genet;33(4):513–8.
12. Shirazi A, Motaghi E. (2013), The in vitro fertilization of ovine oocytes in the presence of oviductal cells and its effect on the expression of zygote arrest 1 (zar1) and subsequent embryonic development. J Reprod Infertil;14:8–16.
13. Romaoa R, Marquesb CC, Baptistab MC, Vasquesb MI, Barbasb JP, Hortab AEM, Carolinob N, Bettencourta dE, Planchac C, Rodriguess P, Pereira RM. (2013), Evaluation of two methods of in vitro production of ovine embryos using fresh or cryopreserved semen. Small Ruminant Res;(110):36–41.
14. Moawad AR, Fisher P, Zhu J, Choi I, Polgar Z, Dinnyes A, et al. (2012), In vitro fertilization of ovine oocytes vitrified by solid surface vitrification at germinal vesicle stage. Cryobiology;65(2):139–44.
15. Ispada J, Rodrigues TA, Risolia PHB, Lima RS, Goncalves DR, Rettori D, Nichi M, Feitosa WB, Paula-Lopes FF. (2018). Astaxanthin counteracts the effects of heat shock on the maturation of bovine oocytes. Reprod Fertil Dev
16. Wang Z., Lin P., Yu S., (2013), Effects of ghrelin on developmental competence and gene expression of in vitro fertilized ovine embryos. Theriogenology 79, 695–701.

The result of *in vitro* fertilization of mongolian sheep oocytes

Erdenetogtoh P., Otgonjargal S., and Ganbat S.*

School of Veterinary Medicine, Mongolian University of Life Sciences, Ulaanbaatar, Mongolia

*Corresponding author: ganbat_vet@muls.edu.mn

ABSTRACT

The effects of astaxanthin (Ax) were tested in ovine oocytes during the maturational culture. Oocytes were cultured for 22 hours in with or without 500 ng/ml Ax. Oocytes and embryos were cultured in the multi-incubator with 39°C till the development stage of blastocysts during 7 days. After maturational culture, the embryos transferred to the synchronized recipients.

Fertilization rate was similar in Ax-treated oocytes and in non-treated oocytes. The development of blastocysts in the Ax-treated oocytes tended to be higher than in non-treated oocytes (P=0.06). These results indicate that Ax treatment improves the developmental competence of ovine oocytes. The first lambs were born in Mongolia using the method of *in vitro* culture.

KEYWORD: Oocytes, morul, blastocyst, embryo, antioxidant