

## ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ДИБУТИРИЛ-ЦИКЛИЧЕСКОГО АДЕНОЗИНМОНОФОСФАТА ДЛЯ КАПАЦИТАЦИИ СПЕРМАТОЗОИДОВ ПРИ ПОЛУЧЕНИИ ЭМБРИОНОВ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА *in vitro*

© 2019 г. И. Г. Сметанина\*, @, Л. В. Татаринov\*, А. С. Кривохарченко\*\*

\*Всероссийский научно-исследовательский институт физиологии, биохимии и питания животных – ВИЖ им. Л.К. Эрнста – Федеральный научный центр животноводства, пос. Институт, Калужская обл., Боровск, 243013 Россия

\*\*Институт химической физики им. Н.Н. Семенова РАН, ул. Косыгина, 4, Москва, 119991 Россия

@E-mail: sme.irina2011@yandex.ru

Поступила в редакцию 21.05.2018 г.

После доработки 02.07.2018 г.

Принята к публикации 02.07.2018 г.

Проанализирована возможность создания химически “определенной” системы капацитации сперматозоидов крупного рогатого скота (КРС) *in vitro*. Отмечено, что в безбелковую среду оплодотворения Тироде вместо 10 мкг/мл гепарина вводили в качестве капацитирующего агента 100 мкМ дибутирил-циклического аденозинмонофосфата (дбцАМФ), причем среда оплодотворения не содержала глюкозу, а также какие-либо добавки, активирующие сперматозоиды. Впервые показано, что капацитированные в безбелковой среде только с помощью дбцАМФ сперматозоиды могут с высокой эффективностью оплодотворять *in vitro* ооциты КРС, созревшие вне организма также в среде без белка. Критерием нормального оплодотворения выбрано развитие эмбрионов до 4–8-клеточной стадии.

DOI: 10.1134/S0002332919040131

Общеизвестно, что в момент эякуляции сперматозоиды млекопитающих не обладают способностью пенетрировать созревшие ооциты и должны в первую очередь приобрести оплодотворяющую способность, которая возникает вследствие инкубации в течение нескольких часов (Chang, 1951; Austin, 1952). Остин (Austin, 1952) назвал этот феномен капацитацией. Капацитация включает в себя различные физиологические изменения в сперматозоидах, начинающиеся со связывания и удаления протеинов семенной плазмы с их поверхности (Brackett, Oliphant, 1975), что в конечном счете приводит к гиперактивации и после воздействия соответствующих стимулов к акросомальному экзоцитозу (Yanagimachi, 1994).

В зависимости от видов капацитация *in vivo* происходит в матке или яйцевоме (Yanagimachi, 1994). У некоторых видов капацитация может спонтанно происходить в течение инкубации *in vitro*. Известно, что она может модулироваться протеинами, найденными в жидкостях фолликулов и половых путей (McNutt *et al.*, 1992). Более того, обнаружено, что как яйцеводная, так и фолликулярная жидкости могут стимулировать капацитацию спермы КРС *in vitro* (Parrish *et al.*, 1989; McNutt, Killian, 1991). Гликозаминогликаны, например гепарин (или гепаринсульфат) и гиалуроновая кислота (Lee, Ax, 1984), найденные в

фолликулярной или яйцеводной жидкостях, как полагают, играют важную роль в капацитации сперматозоидов КРС *in vivo*. Гепарин – сульфатированный гликозаминогликан-антикоагулянт (Oscarsson *et al.*, 1989). Считается, что он стимулирует капацитацию посредством связывания и удаления протеинов семенной плазмы, связанных с мембранами сперматозоидов (Miller *et al.*, 1990). Использование гепарина для капацитации сперматозоидов КРС (Parrish *et al.*, 1988) обусловило воспроизводимость методики получения эмбрионов данного вида *in vitro*.

Однако гепарин не единственный участник капацитации. Химически “определенное” соединение дибутирил-циклический аденозинмонофосфат (дбцАМФ) – аналог циклического аденозинмонофосфата (цАМФ), проникающий в клетку за счет повышенной растворимости в липидах, – может играть позитивную роль в оплодотворении и уменьшении времени, требуемого для капацитации сперматозоидов крыс (Toyoda, Chang, 1974) и кроликов (Rosado *et al.*, 1974). Доля оплодотворенных яйцеклеток кролика повышалась после обработки эякулята семени кролика дбцАМФ (Brackett *et al.*, 1975).

Было показано, что обработка эпидидимальных мышинных сперматозоидов 1 мМ дбцАМФ препятствует оплодотворению яйцеклеток мышей, в то

время как дбцАМФ в концентрации 0.1 мМ значительно ускоряет капацитацию, результатом чего было раннее и синхронное оплодотворение яйцеклеток по сравнению с контролем (Fraser, 1981). При использовании дбцАМФ в концентрациях 1 и 10 мкМ повышалась эффективность оплодотворения ооцитов беличьих обезьянок на 50.3 и 50.0% соответственно (Chan *et al.*, 1982). Аналоги цАМФ, дбцАМФ и 8-бromo-цАМФ, стимулировали *in vitro* акросомную реакцию сперматозоидов человека (De Jonge *et al.*, 1991). Обработка одним дбцАМФ или в сочетании с кофеином вела к увеличению доли акросомно-прореагировавших сперматозоидов обезьян-макак по сравнению с контрольной группой или долей, полученной в результате обработки одним кофеином (Vandevoort *et al.*, 1994). Позднее было показано, что в содержащей глюкозу безбелковой среде дбцАМФ может инициировать капацитацию криоконсервированных сперматозоидов КРС *in vitro* в отсутствие гепарина и в присутствии дополнительных активирующих реагентов (Dinkins, Brackett, 2000). Однако способность к оплодотворению сперматозоидов, капацированных с помощью дбцАМФ, и последующее развитие эмбрионов в этой работе не исследовались.

Полученные результаты позволили сделать вывод, что один из ключевых факторов, вовлеченных в процесс капацитации сперматозоидов млекопитающих, — цАМФ (Harrison, 2003). Это заключение нашло подтверждение в дальнейших исследованиях, проведенных на сперматозоидах КРС. Так, выброс цАМФ — критическое событие при капацитации сперматозоидов быка *in vitro* (Osycka-Salut *et al.*, 2014). Недавно были опубликованы данные, подтверждающие, что цАМФ, который в отличие от его аналогов не способен проникать в клетки, тем не менее в концентрации 10 нМ эффективно капацирует сперматозоиды КРС, сообщая им способность оплодотворять ооциты (Alonso *et al.*, 2017). Однако капацитацию и оплодотворение авторы проводили в средах, содержащих белок, бычий сывороточный альбумин (БСА), а критерием оплодотворения служило только наличие в яйцеклетках после инкубации со сперматозоидами двух пронуклеусов.

Таким образом, в процесс капацитации вовлечены многочисленные физиологические события, включая дестабилизацию плазматической мембраны, изменения внутриклеточной концентрации ионов и потенциала мембраны, фосфорилирование белков. Однако молекулярные механизмы этого феномена до конца не поняты (Vadnais *et al.*, 2007; Gangwar, Atreja, 2015; Stival *et al.*, 2016).

Вместе с тем до настоящего времени основной капацирующий агент, используемый для оплодотворения ооцитов КРС *in vitro*, — гепарин (Parrish, 2014). Ранее нами была показана возмож-

ность оплодотворения яйцеклеток КРС в безбелковой среде, где в качестве капацирующего агента также использовали гепарин (Сметанина и др., 2006).

Вместо сульфатированного гликозоаминогликана гепарина биологического происхождения, обычно применяемого для капацитации сперматозоидов КРС *in vitro*, в не содержащую глюкозу и каких-либо добавок, активирующих сперму, химически “определенную” безбелковую среду оплодотворения Тироде вводили химически “определенный” капацирующий агент — дбцАМФ.

Цель исследования — разработка полностью химически “определенной” системы получения эмбрионов КРС вне организма из созревших *in vitro* ооцитов и криоконсервированных сперматозоидов, а также изучение оплодотворяющей способности капацированных таким образом сперматозоидов и полученных в результате оплодотворения эмбрионов к последующему развитию.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для оценки эффективности способа капацитации сперматозоидов КРС с применением дбцАМФ были проведены две серии экспериментов (по три опыта в каждом) с использованием семени двух быков, так как известно, что чувствительность к капацирующим агентам у разных быков-производителей может существенно различаться.

Яичники КРС получали на мясокомбинате и транспортировали в лабораторию в течение 2–3 ч при 30°C в фосфатно-солевой среде Дульбеко (ПанЭко, Россия). Ооциты выделяли из антральных фолликулов диаметром 2–6 мм методом расщечения. Для созревания ооцитов использовали среду 199 HEPES (Sigma, США) с добавлением 5 мкг/мл фолликулостимулирующего гормона (Folltropin, Vetrepharm), 0.3 ед./мл хорионического гонадотропина человека (Ovogest, Intervet), 0.2 мМ пирувата натрия (Sigma), 2 мМ глутамин (Sigma). Для того чтобы исключить возможное влияние неопределенных белковых компонентов, мы, как и ранее (Сметанина и др., 2000, 2006, 2014, 2017), не добавляли сыворотку или сывороточный альбумин к среде созревания. Ооциты созревали в течение 24 ч в атмосфере 5%-ного CO<sub>2</sub> в воздухе при 38.5°C.

Для последующего этапа оплодотворения яйцеклеток *in vitro* были использованы три безбелковых среды, где БСА был заменен на 0.1 мг/мл поливинилалкоголя (ПВА). Остальные составляющие сред также были полностью химически “определенные”, т.е. не содержали компонентов биологического происхождения. Это среда 1 Тироде для подготовки гамет (СГ-1) (Parrish *et al.*, 1985; 1988), среда Тироде с буфером HEPES для отмывания ооцитов (Т-Н), среда Тироде-оплодо-

**Таблица 1.** *In vitro* оплодотворение ооцитов крупного рогатого скота после обработки сперматозоидов гепарином или дбцАМФ

Капацитирующий агент	Число			
	ооцитов	дробящихся эмбрионов (от двух клеток)	эмбрионов на стадии 4–8 клеток (68 ч после начала IVF)	эмбрионов на стадии 8 клеток (68 ч после начала IVF)
Бык Помпей				
10 мкг/мл гепарина (контроль)	78	42 (53.8)	16 (20.5)	1 (1.3)*
100 мкМ дбцАМФ (опыт)	87	55 (63.2)	19 (21.8)	10 (11.5)*
Бык Вал				
10 мкг/мл гепарина (контроль)	62	32 (51.6)**	13 (20.1)**	2 (3.2)
100 мкМ дбцАМФ (опыт)	87	60 (69.0)**	31 (35.6)**	7 (8.0)

Примечание. \* –  $P < 0.01$ ; \*\* –  $P < 0.05$ ; в скобках приведены данные трех опытов в процентах.

творения для совместного инкубирования яйцеклеток и сперматозоидов (Т-О) (Bavister *et al.*, 1977, 1983; Parrish *et al.*, 1988). Созревшие *in vitro* ооциты отмывали в среде Т-Н и помещали для совместного инкубирования со сперматозоидами в 500 мкл Т-О, дополненную 10 мкг/мл гепарина либо 100 мкМ дбцАМФ. В работе использовали сперму быков Помпея и Вала. Сперму готовили методом “swim up” (“всплывания”), применяя среду СГ-1 с добавлением пирувата натрия до концентрации 1 мМ. Совместную инкубацию яйцеклеток и сперматозоидов осуществляли в течение 18 ч в атмосфере 5%-ного  $CO_2$  в воздухе при 38.5°C. Для оценки способности зигот к дальнейшему развитию оплодотворенные ооциты трижды отмывали в среде Т-Н, а затем помещали для культивирования в микрокапли синтетической жидкости яйцевода (СЖЯ) без глюкозы, содержащей 1 мМ глутамина, 0.33 мМ пирувата натрия и 3 г/л БСА (Tervit *et al.*, 1972). Культивирование осуществляли в течение 68 ч в атмосфере трехкомпонентной газовой смеси (5%  $CO_2$ , 5%  $O_2$  и 90%  $N_2$ ). Развитие эмбрионов до 4–8-клеточной стадии через 68 ч после начала совместной инкубации ооцитов и сперматозоидов было использовано в качестве критерия нормального оплодотворения и развития.

Статистическую обработку результатов проводили с помощью *t*-критерия Стьюдента.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Данные первой серии экспериментов (бык Помпей) представлены в табл. 1. Показано, что дбцАМФ (опытная группа) капацитирует сперматозоиды КРС также эффективно, как и гепарин (контрольная группа). Достоверных различий между группами по доле эмбрионов, вступивших в дробление и достигших 4–8-клеточной стадии, не наблюдали. Однако следует отметить, что эмбрионы опытной группы развивались до-

стоверно быстрее. Через 68 ч после начала оплодотворения более половины эмбрионов опытной группы, находившихся на стадии 4–8 клеток, достигли 8-клеточной стадии, в то время как в контроле практически все эмбрионы находились на стадии 4–6 клеток.

Вторая серия экспериментов показала (табл. 1), что сперма быка Вала более чувствительна к капацитирующим свойствам дбцАМФ, чем сперма быка Помпея. В опытной группе доля эмбрионов, начавших дробление и достигших стадии 4–8 клеток, была достоверно больше по сравнению с контролем. Однако по скорости развития такой разницы, как в первой серии экспериментов, не наблюдали что свидетельствует об индивидуальных особенностях каждого быка-производителя.

Как отмечено выше, в настоящий момент основной препарат, используемый для капацитации криоконсервированных сперматозоидов КРС *in vitro* – гепарин (Parrish, 2014), который получают из слизистой кишечника свиней. Различные препараты гепарина различаются по химическому составу, что влияет на воспроизводимость результатов. Замена гепарина в процессе приготовления спермы на другой химически “определенный” капацитирующий агент может позволить использовать полностью “определенную” среду для получения эмбрионов КРС.

Подобные исследования позволяют приблизиться к пониманию механизмов феномена капацитации сперматозоидов разных видов млекопитающих. Известны индивидуальные различия отношения сперматозоидов от разных быков к воздействию капацитирующих агентов, в том числе дбцАМФ (Dinkins, Brackett, 2000). Подобное явление также наблюдалось в наших экспериментах.

Вместе с тем внеклеточное воздействие цАМФ индуцирует капацитацию сперматозоидов и обеспечивает оплодотворение *in vitro*, но в средах, содержащих белок. При этом оплодотворение оценивалось

только по формированию пронуклеусов, а способность оплодотворенных яйцеклеток к дроблению и последующее развитие эмбрионов изучено не было (Alonso *et al.*, 2017).

Впервые показана возможность оплодотворения ооцитов и последующего развития полученных эмбрионов КРС *in vitro* после использования в качестве капацитирующего агента дбцАМФ в концентрации 100 мкМ без каких-либо активирующих сперматозоиды добавок. При этом наблюдалось некоторое повышение доли оплодотворенных ооцитов и развивающихся эмбрионов, а также повышение скорости развития эмбрионов по сравнению с таковыми, полученными общепринятым методом капацитации с использованием гепарина. Мы предполагаем, что это может быть связано как с повышением доли капацитированных сперматозоидов, так и с уменьшением временного интервала, необходимого для самого процесса капацитации.

Таким образом, полученный экспериментальный материал демонстрирует возможность использования только дбцАМФ в качестве химически “определенного” капацитирующего агента сперматозоидов КРС *in vitro* вместо сульфатированного гликозаминогликана гепарина биологического происхождения в не содержащей глюкозы химически “определенной” безбелковой среде.

Наши данные подтверждают, что цАМФ играет ключевую роль в капацитации сперматозоидов КРС *in vitro* и позволяют создать полностью “определенную” культуральную систему для получения эмбрионов данного вида вне организма.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант 16-53-52046), Госзаданий АААА-А18-118020690203-8, № 0082-2018-0005 и № 0600-2018-0015.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Сметанина И.Г., Татарина Л.В., Кривохарченко А.С. Влияние состава культуральных сред на созревание ооцитов и развитие эмбрионов крупного рогатого скота *in vitro* // Онтогенез. 2000. Т. 31. № 2. С. 139–143.
- Сметанина И.Г., Татарина Л.В., Кривохарченко А.С. Оплодотворение ооцитов крупного рогатого скота *in vitro* в безбелковой культуральной системе // Онтогенез. 2006. Т. 37. № 6. С. 438–443.
- Сметанина И.Г., Татарина Л.В., Кривохарченко А.С. Влияние гормонов на созревание ооцитов крупного рогатого скота *in vitro* // Бюл. эксперим. биологии и медицины. 2014. Т. 157. № 5. С. 655–658.
- Сметанина И.Г., Татарина Л.В., Кривохарченко А.С. Влияние гипоксантина в низких концентрациях на созревание и оплодотворение ооцитов крупного рогатого скота *in vitro* // Изв. РАН. Сер. биол. 2017. № 5. С. 1–4.

- Alonso C.A.J., Osycka-Salut C.E., Castellano L., Cesari A., Di Siervi N., Mutto A., Johannisson A., Morrell J.M., Davio C., Perer-Martinez S. Extracellular cAMP activates molecular signaling pathways associated with sperm capacitation in bovines // *Mol. Hum. Reprod.* 2017. V. 23. P. 1–14.
- Austin C.R. The capacitation of the mammalian sperm // *Nature.* 1952. V. 170. P. 326.
- Bavister B.D., Yanagimachi R. The effect of sperm extract and energy sources on the motility and acrosome reaction of hamster sperm *in vitro* // *Biol. Reprod.* 1977. V. 16. P. 228–237.
- Bavister B.D., Leibfried M.L., Lieberman G. Development of preimplantation embryos of the golden hamster in a defined culture medium // *Biol. Reprod.* 1983. V. 28. P. 235–247.
- Brackett B.G., Oliphant G. Capacitation of rabbit spermatozoa *in vitro* // *Biol. Reprod.* 1975. V. 12. P. 260–274.
- Brackett B.G., Jeitles G.G., Oh Y.K. Fertilisation by sperm treated with high ionic strength and N<sup>6</sup>,O<sup>2</sup>-dibutyryl adenosine 3':5'-cyclic monophosphoric acid // *Fed. Proc.* 1975. V. 34. P. 456.
- Chan P.J., Hutz R.J., Dukelow W.R. Nonhuman primate *in vitro* fertilization: seasonality, cumulus cells, cyclic nucleotides, ribonucleic acid, and viability assays // *Fertil. Steril.* 1982. V. 38. P. 609–615.
- Chang M.C. Fertilizing capacity of spermatozoa deposited into the fallopian tubes // *Nature.* 1951. V. 168. P. 697–698.
- De Jonge C.J., Han H.L., Lawrie H., Mack S.R., Zaneveld L.J. Modulation of the human sperm acrosome reaction by effectors of the adenylate cyclase/cyclic AMP second-messenger pathway // *J. Exp. Zool.* 1991. V. 258. P. 113–125.
- Dinkins M.B., Brackett B.G. Chlorotetracycline staining patterns of frozen-thawed bull spermatozoa treated with  $\beta$ -cyclodextrins, dibutyryl cAMP and progesterone // *Zygote.* 2000. V. 8. P. 245–256.
- Fraser L.R. Dibutyryl cyclic AMP decreases capacitation time *in vitro* in mouse spermatozoa // *J. Reprod. Fert.* 1981. V. 62. P. 63–72.
- Gangwar D.K., Atreja S.K. Signalling events and associated pathways related to the mammalian sperm capacitation // *Reprod. Dom. Anim.* 2015. V. 50. P. 705–711.
- Harrison R.A.P. Cyclic AMF signaling during mammalian sperm capacitation – still largely terra incognita // *Reprod. Dom. Anim.* 2003. V. 38. P. 102–110.
- Lee C.N., Ax R.L. Concentrations and composition of glycosaminoglycans in the bovine reproductive tract // *J. Dairy Sci.* 1984. V. 67. P. 2006–2009.
- McNutt T., Killian G. Influence of bovine follicular and oviduct fluids on sperm capacitation *in vitro* // *J. Androl.* 1991. V. 12. P. 244–252.
- McNutt T., Rogowski L., Vasilatos-Younken R., Killian G. Adsorption of oviductal fluid proteins by the bovine sperm membrane during *in vitro* capacitation // *Mol. Reprod. Dev.* 1992. V. 33. P. 313–323.
- Miller D.J., Winer M.A., Ax R.L. Heparin-binding proteins from seminal plasma bind to bovine spermatozoa and modulate capacitation by heparin // *Biol. Reprod.* 1990. V. 42. P. 899–915.

- Oscarsson L.G., Pejler G., Lindahl U. Location of the anti-thrombin-binding sequence in heparin chain // *J. Biol. Chem.* 1989. V. 264. P. 296–304.
- Osycka-Salut C., Diez F., Burdet J., Gervasi M.G., Franchi A., Bianciotti L.G., Davio C., Perez-Martinez S. Cyclic AMP efflux, via MRPs and A1 adenosine receptors, is critical for bovine sperm capacitation // *Mol. Hum. Reprod.* 2014. V. 20. P. 89–99.
- Parrish J.J. Bovine *in vitro* fertilization: *In vitro* oocyte maturation and sperm capacitation with heparin // *Theriogenology*. 2014. V. 81. P. 1–12.
- Parrish J.J., Susko-Parrish J.L., First N.L. Effect of heparin and chondroitin sulfate on the acrosome reaction and fertility of bovine sperm *in vitro* // *Theriogenology*. 1985. V. 24. P. 537–549.
- Parrish J.J., Susko-Parrish J.L., Winer M.A., First N.L. Capacitation of bovine sperm by heparin // *Biol. Reprod.* 1988. V. 38. P. 1171–1180.
- Parrish J.J., Susko-Parrish J.L., Handrow R., Sims M., First N.L. Capacitation of bovine spermatozoa by oviduct fluid // *Biol. Reprod.* 1989. V. 40. P. 1020–1025.
- Rosado A., Hicks J.J., Reyes A., Blanco I. Capacitation *in vitro* of rabbit spermatozoa with cyclic adenosine mono-phosphate and human follicular fluid // *Fert. Steril.* 1974. V. 25. P. 821–824.
- Stival C., Puga Molina Ldel C., Paudel B., Buffone M.G., Visconti P.E., Krapf D. Sperm capacitation and acrosome reaction in mammalian sperm // *Adv. Anat. Embryol. Cell. Biol.* 2016. V. 220. P. 93–106.
- Tervit H.R., Whittingham D., Rowson I. Successful culture *in vitro* of sheep and cattle ova // *J. Reprod. Fertil.* 1972. V. 30. P. 493–497.
- Toyoda Y., Chang M.C. Capacitation of epididymal spermatozoa with high K/Na ratio and cyclic AMP for the fertilization of rat eggs *in vitro* // *J. Reprod. Fert.* 1974. V. 36. P. 125–134.
- Vadnais M.L., Galantino-Homer H.L., Althouse G.C. Current concepts of molecular events during bovine and porcine spermatozoa capacitation // *Arch. Andrology: J. Reprod. Systems*. 2007. V. 53. P. 109–123.
- Vandervoort C.A., Tollner T.L., Overstreet J.W. Separate effects of caffeine and dbcAMP on macaque sperm motility and interaction with the zona pellucida // *Mol. Reprod. Dev.* 1994. V. 37. P. 299–304.
- Yanagimachi R. Mammalian fertilization // *The physiology of reproduction* / Eds Knobil E., Neill J.D. N.Y.: Raven Press, 1994. P. 189–317.

## The Use of Dibutyl Cyclic Adenosine Monophosphate for Sperm Capacitation during Production of Bovine Embryos *in vitro*

I. G. Smetanina<sup>1, #</sup>, L. V. Tatarinova<sup>1</sup>, and A. S. Krivokharchenko<sup>2</sup>

<sup>1</sup>All-Russia Research Institute of Animal Physiology, Biochemistry, and Nutrition – Ernst VIJ – Federal Research Center, pos. Institute, Kalugaskaia obl., Borovsk, 240913 Russia

<sup>2</sup>Semenov Institute of Chemical Physics, Russian Academy of Sciences, ul. Kosygina 4, Moscow, 119991 Russia

<sup>#</sup>e-mail: sme.irina2011@yandex.ru

The possibility of creating a chemically defined system of bovine sperm capacitation *in vitro* was analyzed. It is noted that in a protein-free medium of fertilization instead of 10 µg/mL of heparin was injected 100 µM dibutylcyclic adenosine monophosphate (dbcAMP). In this case, the fertilization medium did not contain glucose, as well as any additives that activate sperm. It was shown that capacitated in protein-free medium only through dbcAMP sperm can with high efficiency to fertilize *in vitro* of bovine oocytes, matured *in vitro* also in the medium without protein. The development of embryos up to 4–8 cell stages was chosen as the criterion of normal fertilization.