



# **ВОЗМОЖНОСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ ГОРМОНОВ ЧЕЛОВЕКА ДЛЯ СОЗРЕВАНИЯ ООЦИТОВ СВИНЕЙ IN VITRO**

**Докладчик – Сметанина Ирина Геннадьевна, к.б.н.**

**ВНИИФБиП – филиал ВИЖ им. Л.К.Эрнста**

**Москва – 2023**



**Свиньи как вид получают все более широкое применение в области биомедицинских исследований и есть повышенный интерес в использовании трансгенных свиней как потенциальных доноров для ксенотрансплантации в будущем. Так как большинство исследований, которые направлены на получение трансгенных свиней через пересадку ядер (то есть клонирование) или через пронуклеарную инъекцию (то есть транскенез) идет с использованием созревших ооцитов и ранних эмбрионов, соответственно, становится все более важным получать большое число ооцитов с компетенцией к развитию.**

**Однако, эффективность получения эмбрионов свиней *in vitro* остается относительно низкой. Одним из основных условий полноценного созревания ооцитов *in vitro* является правильно подобранная гормональная схема.**



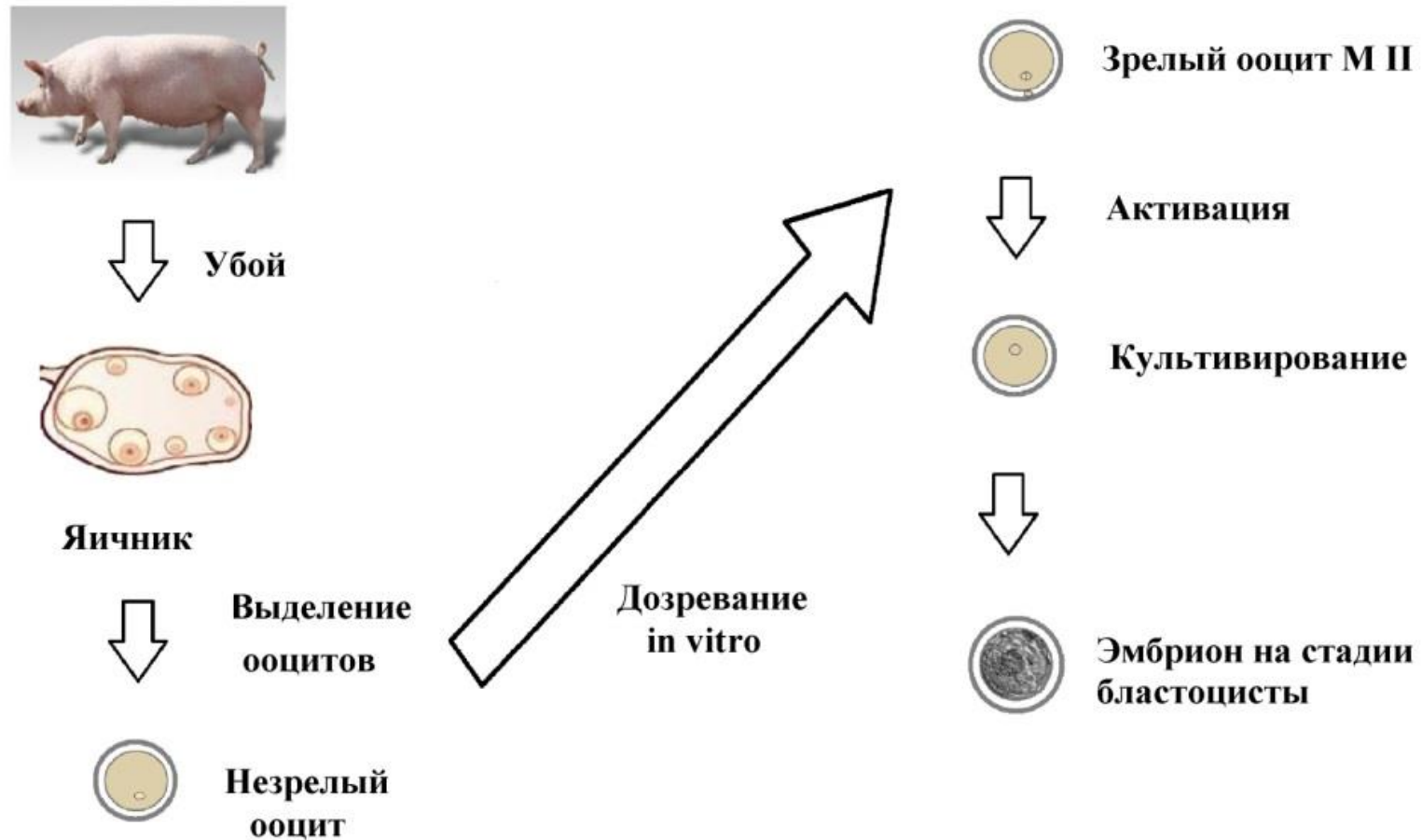
**С другой стороны, механизмы созревания и оплодотворения у таких домашних животных как свинья или корова более близки человеку, чем у мышей. Следовательно, ооциты свиней становятся важной моделью для изучения молекулярного контроля мейотического цикла и процессов оплодотворения. А также могут использоваться для тестирования гормонов, применяемых для ЭКО человека.**

**Целью наших исследований было изучить возможность использования двух препаратов человеческого хорионического гонадотропина ( **Ovogest** - хорионический гонадотропин человека, полученный из мочи и используемый для обработки животных; **Pregnyl** – хорионический гонадотропин человека, полученный из мочи и используемый в программах экстракорпорального оплодотворения человека) для созревания ооцитов свиней *in vitro*.**

## **МАТЕРИАЛЫ и МЕТОДЫ**

**Яичники свиней получали на мясокомбинате Обнинского колбасного завода (Калужская обл.) и транспортировали в лабораторию в течение 30 минут при температуре 30°C в фосфатно-солевой среде Дюльбекко (“ПанЭко”, Россия). Для созревания ооцитов и культивирования эмбрионов использовали коммерческую среду фирмы “Life-Global” (global HP 1868), разработанную для культивирования эмбрионов человека от зиготы до стадии бластоцисты и содержащую 8.8 мг/мл человеческого сывороточного альбумина. Для созревания ооцитов свиней в среду добавляли 10 IU/ml “Фоллигон” (ГСЖК, “Intervet”, Нидерланды), 8 IU/ml “Ovogest” (хГч, “Intervet”, Нидерланды) или 8 IU/ml “Pregnyl” (хГч, Нидерланды), 0.2 мМ пирувата натрия, 2 мМ глутамина (“Sigma”, США) и 100 ед. пенициллина/ 100 мкг стрептомицина (“ПанЭко”, Россия) на 1 мл среды.**

# Схема получения бластоцист свиней



**Ооциты культивировали при температуре 38.5° С в атмосфере 5 %-ного CO<sub>2</sub> в воздухе в течение 45 часов. Ооциты, окруженные слоем кумулюсных клеток были денудированы с использованием 0.1%-ной гиалуронидазы. Критерием созревания ядра являлось наличие первого направительного тельца (МII).**

**Активацию проводили путем инкубации с 10 мкМ кальциевым ионофором A23187 (“Sigma”, США) в течение 3 мин., а затем группы клеток культивировались с 2 мМ 6-DMAP (“Sigma”, США) на протяжении 3 часов.**

**После активации клетки культивировали под слоем минерального масла (“Sigma”, США) в атмосфере трехкомпонентной газовой смеси – 90% N<sub>2</sub>, 5% O<sub>2</sub> и 5% CO<sub>2</sub> в течение 8,5 суток.**

# Созревание ооцитов свиней при культивировании с различными препаратами хорионического гонадотропина человека (хГч)

| Препарат хГч       | Исходное кол-во ооцитов, п | Кол-во ооцитов, достигших стадии МII и активированных, п(%) | Кол-во дробящихся эмбрионов от 2 клеток, п (% от активированных) | Бластоцисты, п (% от активированных) | Бластоцисты, п (% от дробящихся) |
|--------------------|----------------------------|-------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------|--------------------------------------|----------------------------------|
| Ovogest (контроль) | 79                         | 47 (59,5)                                                   | 42 (89,4)                                                        | 11 (23,4)                            | 11 26,2)a                        |
| Pregnyl (опыт)     | 72                         | 33 (45,8)                                                   | 27 (81,8)                                                        | 14 (42,4)                            | 14(51,9)b                        |

**Результаты эксперимента показали, что в среде с Ovogest есть тенденция к улучшению созревания ядра по сравнению с вариантом с Pregnyl (без достоверной разницы) – 59.5% vs 45.8%. Ооциты, достигшие стадии MII, дробились примерно одинаково в обоих вариантах (89.4% vs 81.8%). Но, процент полученных бластоцист, как от общего числа активированных яйцеклеток, так и от числа дробящихся, был явно больше в варианте с Pregnyl (42.4% vs 23.4% без достоверной разницы и 51.9% vs 26.2% с достоверностью  $P < 0.05$ , соответственно).**



**Таким образом, впервые было показано, что препарат хорионического гонадотропина человека Pregnyl, разработанный для экстракорпорального оплодотворения у людей, позволяет получать эмбрионы свиней до преимплантационной стадии – бластоцисты. Кроме того, мы подтвердили возможность использования системы созревания ооцитов для тестирования гормонов, применяемых в программах ЭКО.**



# **Благодарности**

**Выражаю благодарность Татариновой  
Людмиле Викторовне и Кириенко  
Константину Владимировичу за  
активное содействие в проведении  
данной серии экспериментов**

Спасибо за  
внимание!