

**ПОДДЕРЖАНИЕ ПАРТЕНОГЕНЕТИЧЕСКОГО
РАЗВИТИЯ IN VITRO ООЦИТОВ СВИНЕЙ С
ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ХОРИОНИЧЕСКОГО
ГОНАДОТРОПИНА ЧЕЛОВЕКА**

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

ВНИИФБиП – филиал ВИЖ им. Л.К.Эрнста

Москва – 2024



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 транsgенез) 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 (Овогест - хорионический гонадотропин человека, полученный из мочи и используемый для обработки животных; Прегнил – 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.

Ооциты культивировали при температуре 38.5° С в атмосфере 5 %-ного CO₂ 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% N₂, 5% O₂ и 5% CO₂ в течение 8,5 суток.

Схема получения бластоцист свиней



↓ Убой

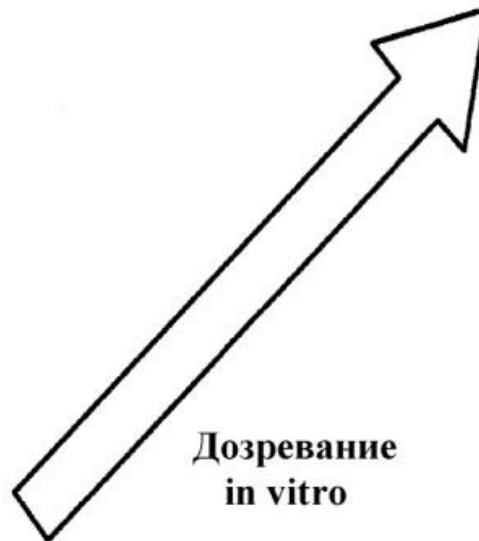


Яичник

↓ Выделение
ооцитов



Незрелый
ооцит



Зрелый ооцит М II



Активация



Культивирование



Эмбрион на стадии
бластоцисты

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

Препарат хГч	Исход- ное кол- во ооцитов ,п	Кол-во ооцитов, достигших стадии МII и активиров- анных, п(%)	Кол-во дробящихся эмбрионов от 2 клеток ,п (% от активиро- ванных)	Бластоцис- ты, п (% от активиро- ванных)	Бласто- цисты, п (% от дробя- щихся)
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.

Спасибо за
внимание!