

**ИСПОЛЬЗОВАНИЕ КОММЕРЧЕСКИХ СРЕД, РАЗРАБОТАННЫХ
ДЛЯ ЭМБРИОНОВ ЧЕЛОВЕКА, В ЭКСПЕРИМЕНТАХ ПО СОЗРЕВАНИЮ
in vitro ООЦИТОВ СВИНЕЙ**

Сметанина И.Г., Татарнинова Л.В., Кириенко К.В., Максименко С.М.

*ВНИИ физиологии, биохимии и питания животных - филиал ФНЦ животноводства
ВИЖ им. Л.К. Эрнста, Боровск Калужской обл., Российская Федерация,*

Поскольку коммерческие среды, разработанные для культивирования эмбрионов человека, проходят предварительное тестирование на мышинных эмбрионах, то, согласно авторской рабочей гипотезе, имеется потенциальная возможность проводить этот этап и на других видах млекопитающих, в частности, на эмбрионах КРС или свиней. Продуктивные животные имеют определённые преимущества для моделирования развития человеческих эмбрионов, поскольку репродуктивная физиология этих животных изучена достаточно хорошо, их репродуктивные органы доступны в большом количестве по низкой цене, и для сбора эмбрионов у этих видов разработаны как хирургические, так и нехирургические техники. Продолжительность жизни большинства продуктивных видов ближе к таковой у человека (по сравнению с грызунами как модельными животными), что может быть особенно важно при попытке исследовать на модельных животных влияния возраста на гаметы и жизнеспособность эмбрионов. Среда для культивирования гамет КРС и свиней пока готовятся индивидуально в каждой лаборатории, что существенно снижает воспроизводимость методик и экспериментальных данных. Использование готовых коммерческих сред позволило бы избежать отрицательного влияния этого фактора. В данной работе изучена возможность созревания ооцитов свиней *in vitro* в коммерческой среде фирмы Life Global, разработанной для культивирования эмбрионов человека. Критерием успешного созревания считали наличие первого направительного тельца (стадия МП), а также способность созревших ооцитов достигать стадии морулы/бластоцисты после искусственной (партеногенетической) активации. Показано, что 51,8% ооцитов достигали стадии МП. После искусственной активации 52,3% яйцеклеток вступало в дробление и 33,6% яйцеклеток (63,6% от дробящихся эмбрионов) достигало стадии морулы/бластоцисты. Полученные результаты показывают, что коммерческая среда фирмы Life-Global, разработанная для культивирования эмбрионов человека, может быть применена для созревания ооцитов свиней *in vitro*, что подтверждено успешным использованием яйцеклеток в экспериментах по партеногенетической активации эмбрионов.

Ключевые слова: свиньи, ооциты, созревание in vitro, партеногенетическая активация

Проблемы биологии продуктивных животных, 2018, 4: 110-115

Введение

Исследования по получению эмбрионов продуктивных животных *in vitro* (IVP – *in vitro production*) представляют интерес и с практической, и с научной точек зрения. В последние годы в мире получают *in vitro* порядка 500 тыс. эмбрионов, пригодных для трансплантации. Основная часть работ (около 80%) по трансплантации коммерческих эмбрионов проводится в Бразилии (Stroud, 2012). Несмотря на то, что технология получения эмбрионов *in vitro* за последние годы значительно шагнула вперед, IVP-эмбрионы до сих пор отличаются от получаемых *in vivo*. Из *in vivo* созревших ооцитов в настоящее время можно

получать до 70% бластоцист, а из *in vitro* созревших ооцитов — не более 50%. Поэтому целью дальнейших исследований по повышению качества и компетенции к развитию созревших ооцитов должно быть создание *in vitro* таких условий, которые максимально приближены к таковым *in vivo* (Wrenzycki, Stinshoff, 2013). Для того, чтобы максимально использовать потенциал гамет, находящихся в яичнике, необходимо разработать такие культуральные системы, которые обеспечивают наиболее адекватное окружение для выживания ооцитов вне организма. Такие культуральные системы могут быть пригодны не только как экспериментальные модели для изучения механизмов развития ооцитов, но также как системы для практического применения в медицине и сельском хозяйстве (Hirao, 2011).

В течение последних лет авторами изучалась возможность применения ряда коммерческих сред, разработанных для эмбрионов человека, в экспериментах по оплодотворению *in vitro* и культивированию гамет и эмбрионов крупного рогатого скота (КРС). Была показана принципиальная возможность использования сред, разработанных для человеческих эмбрионов, в экспериментах по культивированию гамет и эмбрионов КРС (Сметанина и др., 2014), что может представлять интерес и в научном плане, и с практической точки зрения.

Поскольку эти коммерческие среды проходят предварительное тестирование на мышинных эмбрионах, то по нашей рабочей гипотезе имеется потенциальная возможность проводить этот этап и на других видах млекопитающих, в частности, на эмбрионах КРС или свиней. С другой стороны, до сих пор среды для культивирования гамет КРС и свиней готовятся индивидуально в каждой лаборатории, что существенно снижает воспроизводимость методик и экспериментальных данных. Использование готовых коммерческих сред позволило бы избежать отрицательного влияния этого фактора. С научной точки зрения подобное “межвидовое” использование сред позволило бы лучше изучить метаболические потребности доимплантационных эмбрионов различных видов млекопитающих в исследованиях *in vitro*.

Пока ещё не достигнуто чёткого консенсуса по поводу того, какой из видов наиболее пригоден в качестве модельного, так как каждый вид животных имеет как общие свойства, так и различия по отношению к репродуктивной функции человека (Wall, Shani, 2008; Krisher, 2012). В целом, применительно к медицине человека, использование в эксперименте более филогенетически близких к человеку видов приводят к более обоснованным и адекватным результатам. Для принятия решения, какой вид животных выбрать в качестве модели для оценки раннего эмбрионального развития у людей, имеет важное значение множество параметров, в том числе:

- длина фолликулярного цикла,
- число овуляторных фолликулов,
- время созревания ооцитов и временные промежутки этапов оплодотворения,
- время перехода с материнского генома на геном зиготы,
- промежуток времени, требуемый для образования бластоцисты,
- вылупление бластоцисты и взаимодействие с материнскими тканями,
- установление беременности и тип имплантации.

Продуктивные животные имеют определённые преимущества для моделирования развития человеческих эмбрионов, поскольку репродуктивная физиология этих животных изучена достаточно хорошо. Вдобавок, их репродуктивные органы доступны в большом количестве по низкой цене, и для сбора эмбрионов у этих видов разработаны как хирургические, так и нехирургические техники. Продолжительность жизни большинства продуктивных видов ближе к таковой у человека (по сравнению с грызунами как модельными животными), что может быть особенно важно при попытке исследовать на модельных животных влияние возраста на гаметы и жизнеспособность эмбрионов.

Момент перехода с материнского генома на геном зиготы у людей совпадает с таковым у свиней (4 клетки), в то время как у мышей это происходит на 2-х клеточной

стадии. Нет продуктивных животных, идентичных человеку по времени формирования бластоцист, хотя эмбрионы свиньи наиболее близки в этом отношении.

Можно предположить, что физиологические события в развитии предимплантационных эмбрионов у человека будут лучше изучены с использованием различных моделей животных. Это касается и влияния состава культуральной среды, и таких процессов, как генетическая транскрипция, синтез белков, регуляция окислительно-восстановительного баланса, формирование бластоцисты и множество других физиологических параметров.

Очень вероятно, что мы никогда не сможем обеспечить полную адекватность экстраполяции к человеку научных результатов, полученных на модельных животных, но есть возможность получать хорошие данные для методических подходов, которые могут быть также использованы в клинических опытах по программам ЭКО.

Цель данного исследования – изучить возможности полноценного созревания яйцеклеток свиней в коммерческих средах, разработанных для культивирования эмбрионов человека.

Материал и методы.

Яичники свиней получали на мясокомбинате пос. Кривское (г. Обнинск Калужской обл.) и транспортировали в лабораторию в течение 30 мин. при температуре 30-33°C в фосфатно-солевой среде Дюльбекко (ПанЭко, Россия). Ооциты выделяли из антральных фолликулов диаметром 2-8 мм методом рассечения. Для эксперимента отбирали ооциты с многослойным компактным кумулюсом. Для созревания ооцитов использовали коммерческую среду фирмы Life-Global (global HP 1868, Бельгия), разработанную для культивирования эмбрионов человека от зиготы до стадии бластоцисты и содержащую человеческий сывороточный альбумин в концентрации 8.8 мг/мл.

Для созревания ооцитов свиней в среду добавляли Фоллигон (ГСЖК, производство Intervet, Нидерланды), 6 МЕ/мл, Ovogest (xГч, Intervet, Нидерланды), 8 МЕ/мл, 0.2 мМ пирувата натрия, 2 мМ глутамин (Sigma, США) и 100 ед. пенициллина/100 мкг стрептомицина (ПанЭко, РФ) на 1 мл среды.

Ооциты, окружённые слоем кумулюсных клеток, были денудированы с использованием 0.1%-ной гиалуронидазы в среде фирмы Sage (Sage-HEPES, Quinn's Advantage medium with HEPES, США), предназначенной для работы с эмбрионами человека на воздухе. Критерием созревания считали наличие первого направительного тельца (стадия МII).

Активацию проводили путем инкубации яйцеклеток с 10 мкМ кальциевым ионофором A23187 (Sigma, США) в среде Sage-HEPES в течение 3 мин, затем группы клеток культивировали в среде Life-Global (global HP 1868, Бельгия) с 2 мМ 6-DMAP (Sigma, США) в течение 3 ч.

После активации эмбрионы культивировали в микрокаплях среды фирмы Life-Global (global HP 1868, Бельгия) под слоем минерального масла (Sigma, США), в атмосфере трехкомпонентной газовой смеси – 90% N₂, 5% O₂ и 5% CO₂ в течение 8.5 суток.

Результаты и обсуждение

Результаты первой серии экспериментов показали, что из 407 ооцитов, поставленных на созревание в коммерческой среде фирмы Life-Global, 211 достигло стадии МII (51.8%, рис. 1).

Во второй серии экспериментов из 265 яйцеклеток (ооциты на стадии МII), полученных в среде фирмы Life-Global, а затем подвергнутых партеногенетической активации, 52.8% эмбрионов вступило в дробление, 33.6% (или 63.6% от дробящихся эмбрионов) достигло стадии морулы/бластоцисты (рис. 2).

Полученные результаты показывают, что коммерческая среда фирмы Life-Global, разработанная для культивирования эмбрионов человека, может быть применена для созревания ооцитов свиней *in vitro*, что подтверждено успешным использованием яйцеклеток в экспериментах по партеногенетической активации эмбрионов.

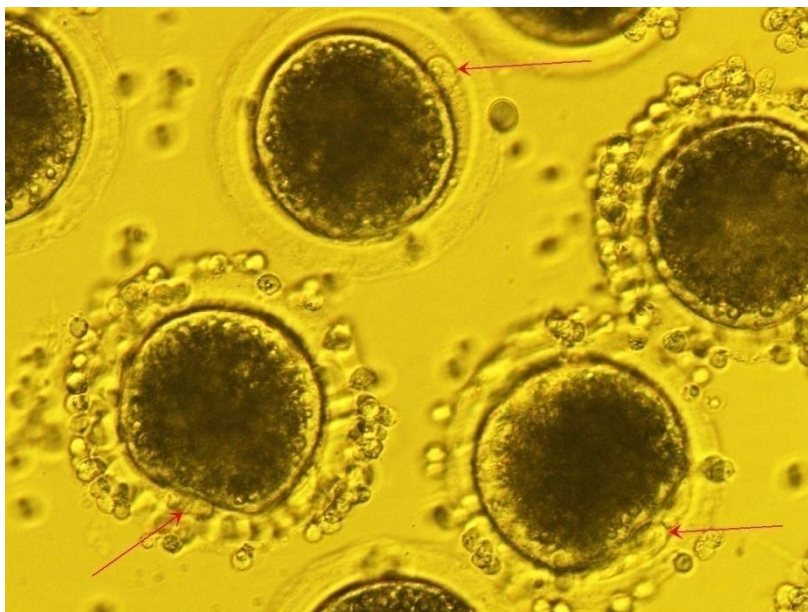


Рис. 1. Ооциты, созревшие in vitro (стрелками отмечены первые направительные тельца – стадия МII).

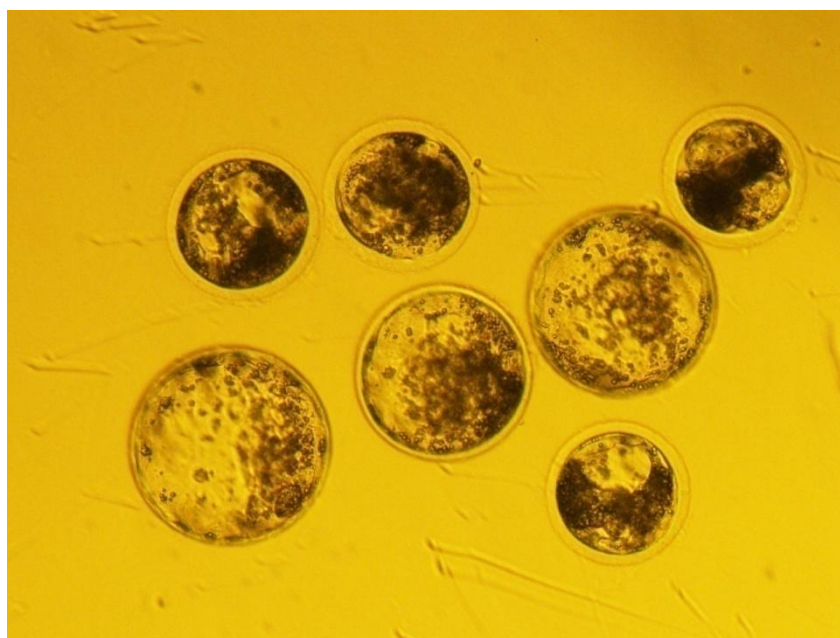


Рис. 2. Партеногенетические эмбрионы

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, направленных на получение трансгенных свиней через пересадку ядер (то есть клонирование) или через пронуклеарную инъекцию (то есть трансгенез), проводится с использованием созревших ооцитов и ранних эмбрионов, то соответственно становится всё более важным получать большое число ооцитов с компетенцией к развитию.

Заключение

Установление возможности репрограммирования ядер соматических клеток после пересадки их в энуклеированный ооцит и потребности репаративной медицины привели к усилению внимания к технологии экстракорпорального оплодотворения ооцитов и культивирования эмбрионов свиней. Однако эффективность получения эмбрионов свиней *in vitro* остаётся относительно низкой. Одним из основных условий полноценного созревания ооцитов *in vitro* является правильно подобранная гормональная схема.

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 гормонального контроля мейотического цикла и процессов оплодотворения.

Технология рекомбинантных ДНК позволяет получать гормоны с полным отсутствием контаминации другими гормонами. С другой стороны, использование гормонов, полученных из биологических источников, имеет ряд проблем (по сравнению с рекомбинантными), включая контаминацию другими субстанциями, различия между партиями и распространение возбудителей заболеваний. Следует отметить, что возможность использования рекомбинантных гормонов широко исследовалась на людях; эти гормоны почти два десятилетия применяются в клиниках экстракорпорального оплодотворения. На сельскохозяйственных животных вопрос использования рекомбинантных гормонов исследован значительно меньше. С научной точки зрения подобное “межвидовое” использование гормонов позволило бы лучше изучить *in vitro* метаболические особенности доимплантационных эмбрионов различных видов млекопитающих.

ЛИТЕРАТУРА

1. Сметанина И.Г., Татарина Л.В., Кривохарченко А.С. Использование коммерческих сред, разработанных для эмбрионов человека, в экспериментах по культивированию *in vitro* гамет и эмбрионов крупного рогатого скота // Биофизика живой клетки. – 2014. – Т. 10. – С. 190-192.
2. Hirao Y. Conditions affecting growth and developmental competence of mammalian oocytes *in vitro* // Anim. Sci. J. – 2011. – Vol. 82. – P. 187-197.
3. Krisher R.L. Utility of animals models for human embryo culture development: domestic species // In: Gary D. Smith et al. (Eds.). Embryo Culture: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology. – 2012. – Vol. 12. – P. 27-37.
4. Stroud B. The year 2011 worldwide statistics of embryo transfer in domestic farm animals // In: . Report of the IETS (International Embryo Transfer Society). – 2012. – P. 1-25.
5. Wall R.J., Shani M. Are animal models as good as we think? // Theriogenology. – 2008. – Vol. 69. – P. 2-9.
6. Wrenzycki C., Stinshoff H. Maturation environment and impact on subsequent development competence of bovine oocytes // Reprod. Dom. Anim. – 2013. – Vol. 48(Suppl.). – P. 38-43.

REFERENCES

1. Hirao Y. Conditions affecting growth and developmental competence of mammalian oocytes *in vitro*. Anim. Sci. J. 2011, 82: 187-197.
2. Krisher R.L. Utility of animals models for human embryo culture development: domestic species. In: Embryo Culture: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology (Gary D. Smith et al., eds). 2012, 12: 27-37.

3. Smetanina I.G., Tatarinova L.V., Krivokharchenko A.S. [The use of commercial media developed for human embryos in experiments in vitro cultivation of gametes and bovine embryos]. *Biofizika zhivoi kletki - Biophysics of living cell*. 2014, 10: 190-192. (In Russian)
4. Stroud B. The year 2011 worldwide statistics of embryo transfer in domestic farm animals. *Report of the IETS (International Embryo Transfer Society)*. 2012, P. 1-25.
5. Wall R.J., Shani M. Are animal models as good as we think? *Theriogenology*. 2008, 69: 2-9.
6. Wrenzycki C., Stinshoff H. Maturation environment and impact on subsequent development competence of bovine oocytes. *Reprod. Dom. Anim.* 2013, 48(Suppl): 38-43.

**Use of commercial media developed for human embryo culture,
in experiments for *in vitro* maturation of pigs oocytes**

Smetanina I.G., Tatarinova L.V., Kirienko K.V., Maksimenko S.V.

*Institute of Animal Physiology, Biochemistry and Nutrition - Branch of Ernst Federal
Science Center for Animal Husbandry, Borovsk Kaluga oblast, Russian Federation*

ABSTRACT. Since commercial media developed for the cultivation of human embryos are pre-tested on mouse embryos, then, according to the author's working hypothesis, there is a potential opportunity to conduct this stage also for other mammalian species, in particular for embryos of cattle or pigs. Productive animals have certain advantages for modeling the development of human embryos, since the reproductive physiology of these animals has been studied quite well, their reproductive organs are available in large quantities at a low price, and both surgical and non-surgical techniques have been developed for the collection of embryos. The lifespan of most productive species is closer to that of humans (compared to rodents as model animals), which may be especially important when attempting to study the effects of age on gametes and the viability of embryos on model animals. Environments for the cultivation of gametes of cattle and pigs are as yet being prepared individually in each laboratory, which significantly reduces the reproducibility of the methods and experimental data. The use of ready-made commercial media would avoid the negative impact of this factor. In this paper, the possibility of maturing pigs oocyte *in vitro* in a commercial medium of the company Life Global, developed for the cultivation of human embryos, has been studied. The criterion for successful maturation was the presence of the first orienting calf (stage MII), as well as the ability of maturing oocytes to reach the morula/blastocyst stage after artificial (parthenogenetic) activation. It was shown that 51.8% of the oocytes reached stage MII. After artificial activation, 52.3% of the eggs were splitted and 33.6% of the oocytes (63.6% of the splitting embryos) reached the morula/blastocyst stage. The results show that the media of Life-Global, developed for the cultivation of human embryos, can be used for the maturation of porcine oocytes *in vitro*, which is confirmed by the successful use of eggs in experiments on parthenogenetic activation of embryos.

Keywords: pigs, oocytes, in vitro maturation, parthenogenetic activation

Problemy biologii produktivnykh zivotnykh - Problems of Productive Animal Biology, 2018, 4: 110-115

Поступило в редакцию: 07.08.2018

Получено после доработки: 27.08.2018.

Сметанина Ирина Геннадьевна, к.б.н., с.н.с., 8(961)006-90-49; sme.irina2011@yandex.ru;

Татаринова Людмила Викторовна, н.с., 8(903)564-43-49; lyudtat@yandex.ru;

Кириенко Константин Владимирович, к.б.н., эмбриолог, 8(967)167-79-23;

kkiriyenko@rambler.ru;

Максименко Сергей Васильевич, к.б.н., с.н.с., 8(906)645-02-52; vx136@rambler.ru