

УДК 636.4:591.465.12:612.433.62

DOI 10.25687/1996-6733.prodanimbiol.2024.1.50-56

**ПОДДЕРЖАНИЕ ПАРТЕНОГЕНЕТИЧЕСКОГО РАЗВИТИЯ *in vitro*  
ООЦИТОВ СВИНЕЙ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ХОРИОНИЧЕСКОГО  
ГОНАДОТРОПИНА ЧЕЛОВЕКА**

Сметанина И.Г.

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

Гонадотропины применяют в течение последних 50 лет во вспомогательных репродуктивных технологиях, однако есть данные о том, что гиперстимуляция гормонами может оказывать негативные эффекты на яйцеклетки и на пациентов. Цель исследования - изучить культуральные условия для созревания ооцитов свиней *in vitro* с использованием двух препаратов хорионического гонадотропина человека (хГч): Овогест (Ovogest, 8 IU/ml, Intervet, Нидерланды), полученный из мочи и используемый для обработки животных и Прегнил (Pregnyl, 8 IU/ml, MSD, Нидерланды), полученный из мочи и используемый в программах по экстракорпоральному оплодотворению у человека. Критерием успешного созревания считали наличие первого направительного тельца (стадия метафазы II), а также способность созревших ооцитов достигать стадии бластоцисты после искусственной (партеногенетической) активации. При использовании Овогеста показана тенденция к улучшению созревания ядра по сравнению с Прегнилом (59,5 vs 45,8%). После проведения искусственной активации, ооциты, достигшие стадии метафазы II, дробились примерно одинаково в обоих вариантах (89,4 vs 81,8%); при этом доля полученных бластоцист, и от общего числа активированных и от числа дробящихся после активации яйцеклеток, была больше в варианте с Прегнилом (42,4 vs 23,4% и 51,9 vs 26,2% ( $P < 0,05$ )). Полученные результаты партеногенетической активации эмбрионов свиней показывают, что хГч, применяемый для экстракорпорального оплодотворения у людей, может быть использован для созревания ооцитов свиней *in vitro*. Также представляется возможным использовать систему созревания ооцитов свиней *in vitro* в качестве культуральной модели для тестирования гормонов, применяемых в программах по экстракорпоральному оплодотворению у человека.

*Ключевые слова: ооциты свиньи, хорионический гонадотропин человека, созревание *in vitro*, партеногенетическая активация эмбрионов.*

*Проблемы биологии продуктивных животных, 2024, 1: 50-56.*

## **Введение**

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 (Klymiuk et al., 2010; Niemann, Petersen, 2016). Поскольку большинство исследований по получению трансгенных свиней с использованием пересадки ядер (клонирование) или пронуклеарной инъекции (трансгенез), проводятся с использованием созревших ооцитов и ранних эмбрионов, соответственно,

становится всё более важным получать большое число ооцитов с достаточной способностью к развитию (Uhm et al., 2009; Cho et al., 2009; Uchida et al., 2001).

Установление возможности репрограммирования ядер соматических клеток после пересадки их в энуклеированный ооцит и потребности репаративной медицины привели к усилению внимания к технологии экстракорпорального культивирования ооцитов и эмбрионов свиней (Gruppen 2014; Redel et al., 2019). Однако, эффективность получения эмбрионов свиней *in vitro* остаётся относительно низкой. Одним из основных условий полноценного созревания ооцитов *in vitro* является правильно подобранная схема гормональной обработки.

С другой стороны, механизмы созревания и оплодотворения у таких домашних животных, как свинья или корова, более близки к таковым у человека, чем у мышей (Sun et al., 2001). Следовательно, ооциты свиней становятся более адекватной моделью для изучения молекулярного контроля мейотического цикла и процессов оплодотворения.

Из-за этических ограничений при экспериментировании с человеческими эмбрионами, существует необходимость использования животных в качестве модели для изучения процессов раннего эмбрионального развития у человека. Нет сомнения, что такие модели могут значительно улучшать понимание фундаментальных аспектов раннего эмбрионального развития. Так, разработка среды для IVF (*in vitro* fertilization) хомячка привела к получению первых результатов по IVF на людях (Bavister, 2002). Пока ещё не достигнуто чёткого консенсуса по поводу того, какой из видов наиболее пригоден в качестве модельного, поскольку 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 приводит к получению более обоснованных и адекватных результатов.

Следует отметить, что за последние 20 проведено достаточно большое количество исследований с использованием разнообразных экспериментальных моделей для изучения биологических свойств клеток человека. Так, обсуждается возможность использования овец в качестве экспериментальной модели для изучения биологических свойств гемопоэтических клеток человека (Устюгов, Румянцев, 2014).

Нашей исследовательской группой уже проводились исследования по “межвидовому использованию” самих сред и их составляющих, например, гормонов, применяемых для человеческих эмбрионов, в экспериментах по *in vitro* культивированию эмбрионов коров и свиней (Сметанина и др. 2018; Сметанина и др. 2019).

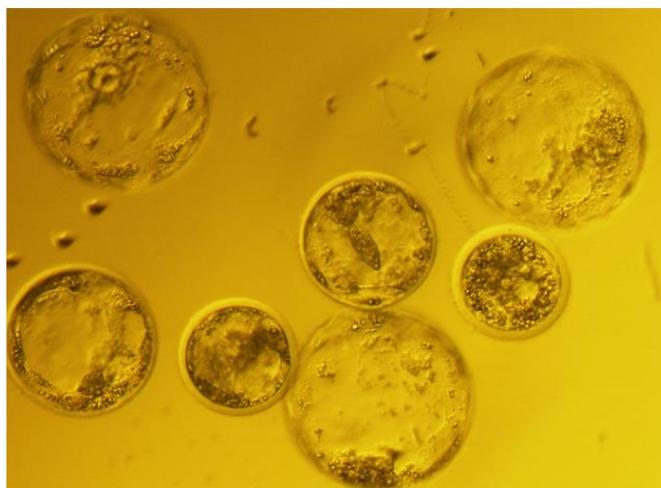
Цель данной работы - изучить культуральные условия для использования двух форм человеческого хорионического гонадотропина (хГч) в исследованиях по изучению способности к созреванию и искусственной активации ооцитов свиней *in vitro*.

## Материал и методы

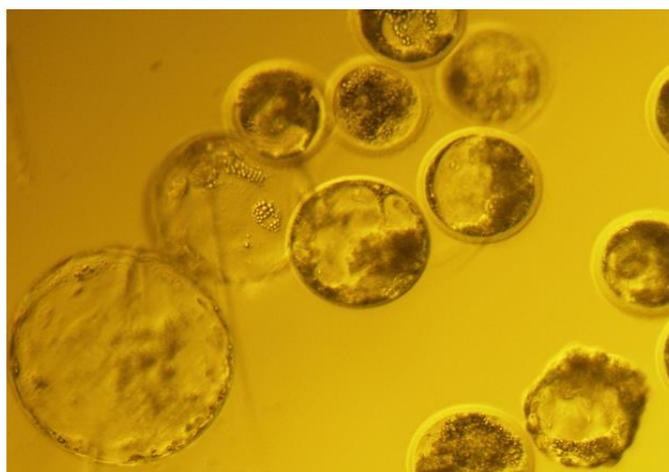
Яичники свиней получали на мясокомбинате и транспортировали в лабораторию в течение 2-3 ч. при температуре 30°C в фосфатно-солевой среде Дюльбекко (ПанЭко, Россия). Ооциты выделяли из антральных фолликулов методом рассечения. Для эксперимента отбирали ооциты с многослойным компактным кумулюсом. Для созревания 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 в среду в разных вариантах опыта добавляли 10 IU/ml фоллигона (гонадотропин сыворотки жеребых кобыл, ГСЖК (Intervet, Нидерланды) и препараты хГч: Ovogest, 8 IU/ml (Intervet, Нидерланды) или Pregnyl, 8 IU/ml (MSD,

Нидерланды); пируват натрия, 0,2 мМ, глутамин, 2 мМ, (Sigma, США) и 100 ед. пенициллина/100 мкг стрептомицина (ПанЭко, Россия) на 1 мл среды.



*Рис. 1. Партеногенетические эмбрионы свиней на стадии бластоцисты, полученные при культивировании в среде созревания с препаратом xГч Ovogest . Ув. × 200.*



*Рис. 2. Партеногенетические эмбрионы свиней на стадии бластоцисты, полученные при культивировании в среде созревания с препаратом xГч Pregnyl. Ув. × 200.*

Ооциты культивировали при температуре 38,5°C в атмосфере 5% CO<sub>2</sub> в воздухе в течение 45 ч. Ооциты, окружённые слоем кумулюсных клеток были денудированы с использованием 0,1%-ной гиалуронидазы. Критерием созревания ядра считали наличие первого направительного тельца (стадия МП).

Активацию проводили путём инкубации с 10 мкМ кальциевым ионофором A23187 (Sigma, США) в течение 3 минут, затем группы клеток культивировали в среде с содержанием 2 мМ 6-диметиламинопурина (6-DMAP, Sigma, США) на протяжении 3 ч. После активации эмбрионы 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 7,5 суток до стадии бластоцисты (рис. 1, 2).

### Результаты и обсуждение

Результаты эксперимента показали (табл. 1), что в среде с Ovogest наблюдалась тенденция к улучшению созревания ядра по сравнению с вариантом с Pregnyl. Ооциты, достигшие стадии МП и подвергнутые искусственной активации, дробились примерно одинаково в обоих вариантах, но процентная доля полученных бластоцист была явно больше в варианте с Pregnyl, как от общего числа активированных яйцеклеток, так и от числа эмбрионов, дробившихся после активации (P<0,05).

Таблица 1. Показатели созревания ооцитов свиной при культивировании с различными препаратами хорионического гонадотропина человека<sup>†</sup>

Препараты хГч	Количество ооцитов, n	Достигло стадии МП и инаktivировано, %	Дробление от 2-х клеток, n (% от активированных)	Количество бластоцист, (% от активированных)	Количество бластоцист, (% от дробящихся)
Ovogest	79	47 (59,5)	42 (89,4)	11(23,4)	11 (26,2)
Pregnyl	72	33 (45,8)	27 (81,8)	14(42,4)	14 (51,9)*

Примечания:<sup>†</sup>Приведена сумма результатов культивирования в двух повторностях; \*P<0,05 по t - критерию (оценка достоверности разности долей) при сравнении результатов опытов с разными препаратами хГч.

Гонадотропины используются в течение последних 50 лет во вспомогательных репродуктивных технологиях. Зачастую в них из-за гиперстимуляции проявляется ухудшающий эффект как на яйцеклетки, так и на пациентов (Yarali, Zeynelogly, 2004). Поэтому, предпринимались попытки использовать систему созревания ооцитов свиной *in vitro* в качестве культуральной модели для тестирования гормонов, применяемых на людях (Sha et al., 2010). Свины близки к человеку по таким параметрам, как момент перехода с материнского генома на геном зиготы (стадия 4-х клеток). У мышей это происходит на 2-х клеточной стадии. Эмбрионы свиной наиболее близки к человеку по времени формирования бластоцист. У людей формирование бластоцист происходит на 5-й день культивирования, в то время как у свиной для этого требуется 6 дней, а у жвачных почти 7 дней. Мышиные предимплантационные эмбрионы развиваются значительно быстрее, бластуляция наблюдается у них в районе 70 часов (Menezo, Herubel, 2002).

Что особенно важно, эпигенетические модификации (паттерны метилирования/деметиличирования ДНК, ацетилирование гистонов и другие эффекты, ведущие к модификации формирования фенотипических признаков) более схожи у человека и продуктивных животных, чем у мышей (Ross, Sampaio, 2010).

Ранее исследовалось влияние гонадотропинов, полученных из мочи женщин в постменопаузе и применяемых в программах экстракорпорального оплодотворения (ЭКО), на созревание ооцитов свиной с использованием в качестве культуральной модели системы созревания ооцитов свиной (Sha et al., 2010). Показано, что при использовании высоких пороговых концентраций гормонов (Repronex, содержащий ФСГ и ЛГ, 40 IU/ml; и Novarel, содержащий хГч, 80 USP/ml) улучшается созревание ооцитов свиной *in vitro*. Повышение концентрации гонадотропинов в культуральной среде приводило к улучшению следующих показателей созревания ооцитов: время достижения ооцитами стадии МП, нормальная конфигурация метафазной пластинки, нормальное выравнивание хромосом, нормальная

миграция кортикальных гранул и митохондрий. Уровень ядерного и цитоплазматического созревания достигал своего пика при концентрациях, близких к пороговым. Однако, авторы этой работы не исследовали влияние высоких концентраций гормонов на развитие эмбрионов до предимплантационных стадий. Нами было показано (Сметанина и др., 2014), что ФСГ в высоких концентрациях (10 и 100 мкг/мл) существенно ухудшает развитие эмбрионов коров до стадии бластоцисты. При исследовании влияния различных доз ФСГ на ядерное созревание эмбрионов мышей также показано, что ФСГ в высокой концентрации (2000 нг/мл) не оказывал влияния на размеры метафазной пластинки, но разброс хромосом по ширине пластинки был значительно больше, по сравнению с ооцитами, созревшими при концентрации ФСГ 2 нг/мл (Roberts et al., 2005). Следовательно, инкубация ооцитов в средах с высокими концентрациями гормонов может индуцировать хромосомные аномалии в ходе созревания *in vitro*. Поэтому развитие эмбрионов до предимплантационных стадий в этих условиях должно тестироваться более тщательно.

В данном исследовании по партеногенетической активации яйцеклеток выявлена возможность использования хГч для созревания ооцитов свиней *in vitro*. Полученные данные можно использовать для тестирования гормонов, применяемых в программах по экстракорпоральному оплодотворению у человека.

### **Заключение**

Результаты, полученные в проведенных экспериментах по партеногенетической активации эмбрионов, показывают, что хГч, применяемый в программах по ЭКО у человека, может быть использован для созревания ооцитов свиней *in vitro*. Также представляется возможным использовать систему созревания ооцитов свиней *in vitro* в качестве культуральной модели для тестирования эффективности действия гормонов, применяемых на людях в программах экстракорпорального оплодотворения.

### **Благодарности**

Выражаю благодарность ведущему эмбриологу Татариновой Людмиле Викторовне за активное участие в проведении экспериментов.

### **Список литературы**

1. Сметанина И.Г., Татаринова Л.В., Кривохарченко А.С. Влияние гормонов на созревание ооцитов крупного рогатого скота *in vitro*. // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2014. № 5. С. 655-658.
2. Сметанина И.Г., Татаринова Л.В., Кириенко К.В., Максименко С.В. Использование коммерческих сред, разработанных для эмбрионов человека, в экспериментах по созреванию *in vitro* ооцитов свиней. // Проблемы биологии продуктивных животных. 2018. №.4. С. 110-115.
3. Сметанина И.Г., Татаринова Л.В., Кривохарченко А.С. Созревание ооцитов крупного рогатого скота *in vitro*: модификация методики с применением рекомбинантного фолликулостимулирующего гормона человека. // Проблемы биологии продуктивных животных. 2019. № 1: С. 25-31.
4. Устюгов А.Ю., Румянцев С.А. Модели для изучения биологических свойств гемопоэтических стволовых клеток человека. // Гены и клетки. 2014. № 1. С. 15-22.
5. Bavister B.D. How animal embryo research led to the first documented human IVF. // RBM Online. 2002. Vol. 4. P. 24-29.
6. Cho S.K., Hwang K.C., Choi Y.J. et al. Production of transgenic pigs harboring the human erythropoietin (hEPO) gene using somatic cell nuclear transfer. // J. Reprod. Fertil. 2009. Vol. 55: P. 128-136.
7. Grupen C.G. The evolution of porcine embryo *in vitro* production. // Theriogenology. 2014. Vol. 81. P. 24-34.

8. Klymiuk N., Aigner B., Brem G. et al. Genetic modification of pigs as organ donors for xenotransplantation. // *Mol. Reprod. Dev.* 2010. Vol. 77. P. 209-221.
9. Krisher R.L. Utility of animal models for human embryo culture development: domestic species. // *Methods in Molecular Biology Embryo Culture: Methods and Protocols* (Gary D. Smith et al., eds). 2012. P. 27-37. 1
10. Menezo Y.J.R., Herubel F. Mouse and bovine models for human IVF. // *RBM Online*. 2002. Vol. 4. P. 170-175.
11. Niemann H., Petersen B. The production of multitransgenic pigs: update and perspectives for xenotransplantation. // *Transgenic Res.* 2016. Vol. 25. P. 361-374.
12. Redel B.K., Spate L.D., Prather R.S. In vitro maturation, fertilization and culture of pig oocytes and embryos. // *Methods Mol. Biol.* 2019. Vol. 2006. P. 93-103.
13. Roberts R., Iatropoulou A., Ciantar D. et al. Follicle-stimulating hormone affects metaphase I chromosome alignment and increases aneuploidy in mouse oocyte matured in vitro. // *Biol. Reprod.* 2005. Vol. 72. P. 107-118.
14. Ross P.J., Sampaio R.V. Epigenetic remodeling in preimplantation embryos: cows are not big mice. // *Anim. Reprod.* 2018. Vol. 15. P. 204-214.
15. Sha W., Xu B.Z., Li M. et al. Effect of gonadotropins on oocytes maturation in vitro: an animal model. // *Fertil. Steril.* 2010. Vol. 93. P. 1650-1661.
16. Sun Q.Y., Lai L., Park K.W. et al. Dynamic events are differently mediated by microfilaments, microtubules, and mitogen-activated protein kinase during porcine oocyte maturation and fertilization in vitro. // *Biol. Reprod.* 2001. Vol. 64. P. 879-889.
17. Uchida M., Shimatsu Y., Onoe K. et al. Production of transgenic miniature pigs by pronuclear microinjection. // *Transgenic Res.* 2001. Vol. 10. P. 577-582.
18. Uhm S.J., Gupta M.K., Das Z.C. et al. Effect of transgene introduction and recloning on efficiency of porcine transgenic cloned embryo production in vitro. // *Reprod. Dom. Anim.* 2009. Vol. 44. P. 106-115.
19. Wall R.J., Shani M. Are animal models as good as we think? // *Theriogenology*. 2008. Vol. 69. P. 2-9.
20. Yarali H., Zeynelogly H.B. Gonadotropin treatment in patients with polycystic ovary syndrome. // *Reprod. Biomed. Online*. 2004. Vol. 8. P. 528-537.

#### **References (for publications in Russian)**

21. Smetanina I.G., Tatarinova L.V., Krivokharchenko A.S. Effects of hormones on in vitro maturation of cattle oocytes]. *Byulleten'eksperimental'noi biologii i meditsiny* (Bulletin of Experimental Biology and Medicine). 2014. 5: 655-658.
22. Smetanina I.G., Tatarinova L.V., Kirienko K.V., Maksimenko S.V. [Use of commercial media developed for human embryo culture in experiments for in vitro maturation of pigs oocytes]. *Problemy biologii produktivnyh zhivotnyh* (Productive animal biology). 2018. 4: 110-115.
23. Smetanina I.G., Tatarinova L.V., Krivokharchenko A.S. [Maturation of bovine oocytes in vitro: modification of the technique with the use of recombinant follicle stimulating human hormone]. *Problemy biologii produktivnyh zhivotnyh* (Productive animal biology), 2019. 1: 25-31.
24. Ustyugov A.Yu., Rummyantsev S.A. [Models for studying the biological properties of human hematopoietic stem cells]. *Geny i kletki* (Genes and Cells). 2014. 1: 15-22.

UDC 636.4:591.465.12:612.433.62

**Support of parthenogenetic development of pig oocytes *in vitro*  
using chorionic human gonadotropin**

Smetanina I.G.

*Institute of Animal Physiology, Biochemistry and Nutrition, branch of the Federal  
Research Center for Animal Husbandry, Ernst VIZh, Borovsk, Kaluga oblast,  
Russian Federation*

**ABSTRACT.** Gonadotropins have been used for the last 50 years in assisted reproductive technologies, but there is evidence that hormonal overstimulation may have negative effects on eggs and patients. The purpose of the study was to study the cultural conditions for the maturation of pig oocytes *in vitro* using two preparations of human chorionic gonadotropin (hCG): Ovogest, 8 IU/ml, Intervet, obtained from urine and used usually for processing animals, and Pregnyl, 8 IU/ml, MS (Netherlands), obtained from urine and used in human *in vitro* fertilization programs. The criterion for successful maturation was the presence of the first guide body (metaphase II stage), as well as the ability of mature oocytes to reach the blastocyst stage after parthenogenetic activation. When using Ovogest, there was a tendency to improve oocytes maturation compared to that with Pregnyl (59.5 vs 45.8%). After artificial activation, oocytes that reached the metaphase II stage were fragmented approximately equally by action in both variants of hCG (89.4 vs 81.8%); at the same time, the proportion of blastocysts obtained, both from the total number of activated eggs and from the number of oocytes split after activation, was greater in the variant with Pregnyl (42.4 vs 23.4% and 51.9 vs 26.2% ( $P < 0,05$ )). The results obtained on parthenogenetic activation of pig embryos indicate that hCG, used for *in vitro* fertilization in humans, can be used for *in vitro* maturation of pig oocytes. It also seems possible to use the pig oocyte maturation system as a culture model for testing efficiency of hormones used in human *in vitro* fertilization programs.

*Key words: pig oocytes, human chorionic gonadotropin, parthenogenetic activation of embryos, in vitro maturation.*

*Problemy biologii produktivnykh zhivotnykh* (Productive Animal Biology). 2024. 1: 50-56.

Поступило в редакцию: 24.12.2023

Получено после доработки: 23.01.2024

Сведения об авторах

**Сметанина Ирина Геннадьевна**, с.н.с, к.б.н., 89610069049, sme.irina2011@yandex.ru