



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

**Докладчик – Сметанина Ирина Геннадьевна к.б.н.,
с.н.с. лаборатории клеточной и генной инженерии
ВНИИФБиП – филиал ВИЖ им. Л.К.Эрнста**

Калуга – 2018



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 трансгенез) идет с использованием созревших ооцитов и ранних эмбрионов, соответственно, становится все более важным получать большое число ооцитов с компетенцией к развитию.

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.



Однако, эффективность получения эмбрионов свиней *in vitro* остается 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 молекулярного контроля мейотического цикла и процессов оплодотворения.

Технология рекомбинантных ДНК позволяет получать гормоны с полным отсутствием контаминации другими гормонами. Использование гормонов, полученных из биологических источников, имеет ряд проблем (по сравнению с рекомбинантными), включая контаминацию другими гормонами, различия между партиями, и распространение возбудителей заболеваний.

Следует отметить, что возможность использования рекомбинантных гормонов широко исследовалась на людях, так как 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 метаболические особенности доимплантационных эмбрионов различных видов млекопитающих *in vitro*.

Целью наших исследований было изучить возможность использования человеческого рекомбинантного хорионического гонадотропина (хГч) для созревания ооцитов свиней *in vitro*.

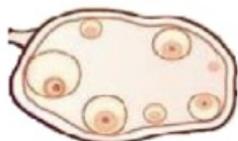
МАТЕРИАЛЫ и МЕТОДЫ

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” (рекомбинантный 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



↓ Убой

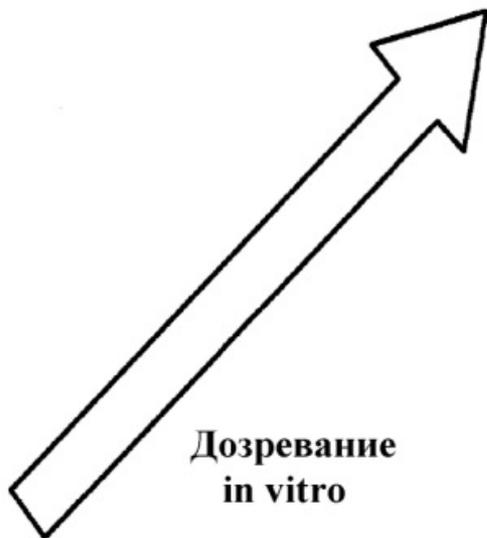


Яичник

↓ Выделение ооцитов



Незрелый ооцит



Дозревание
in vitro



Зрелый ооцит М II



Активация



Культивирование



Эмбрион на стадии бластоцисты

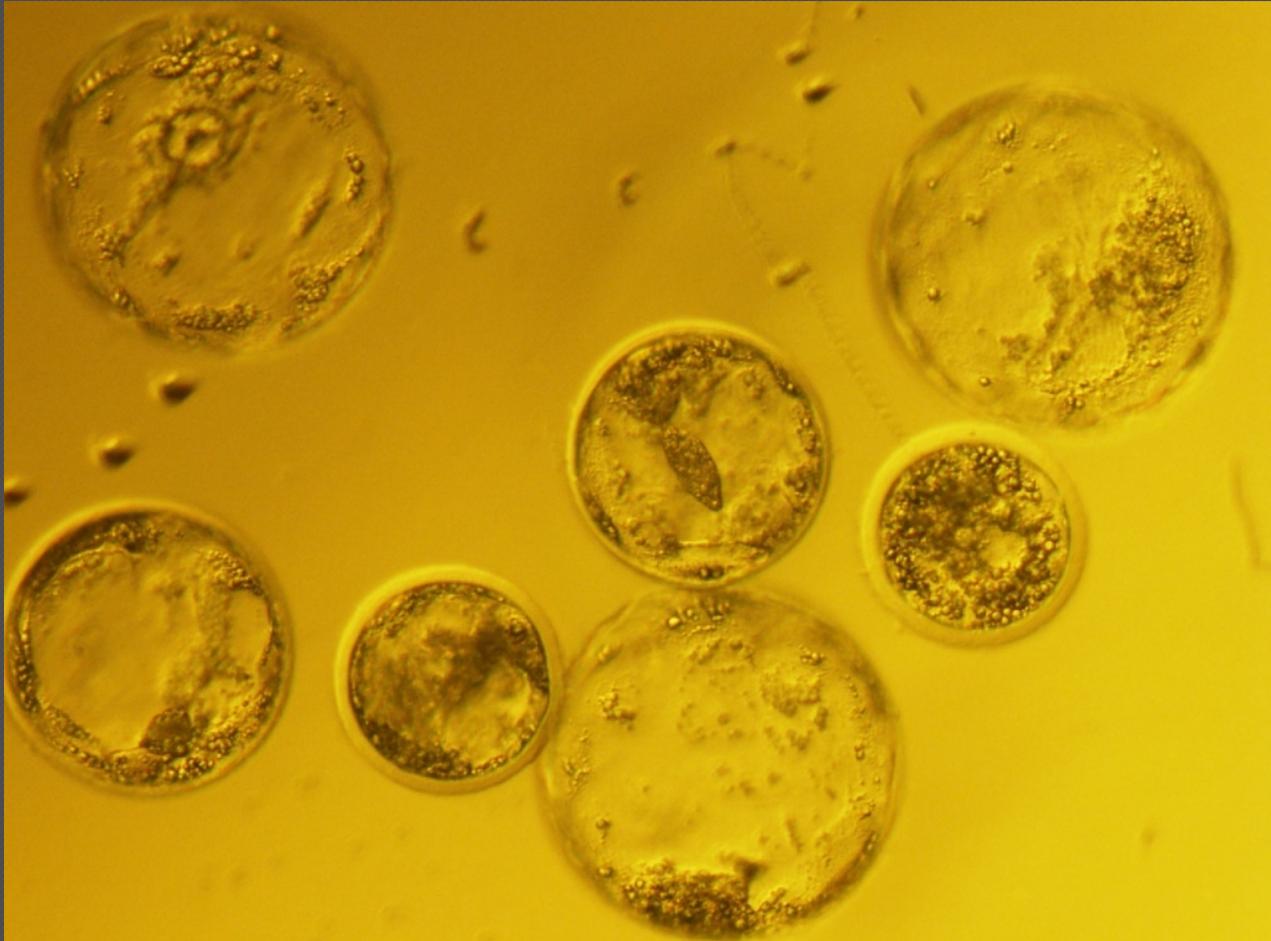
Ооциты культивировали при температуре 38.5° С в атмосфере 5 %-ного CO₂ в воздухе в течение 45 часов. Ооциты, окруженные слоем кумулюсных клеток были денудированы с использованием 0.1%-ной гиалуронидазы. Критерием созревания ядра являлось наличие первого направительного тельца (МШ).

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.

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 МII, 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). Полученные нами результаты показывают, что рекомбинантный хГч, применяемый для “человеческого” ЭКО, может быть успешно использован для созревания ооцитов свиней *in vitro*, что подтверждено успешным использованием яйцеклеток в экспериментах по партеногенетической активации эмбрионов.

Ovogest





Показано, что рекомбинантный хорионический гонадотропин человека, применяемый для экстракорпорального оплодотворения у людей, может быть успешно использован для созревания ооцитов свиней *in vitro*, что подтверждено успешным использованием яйцеклеток в экспериментах по партеногенетической активации эмбрионов.

Спасибо за
внимание!

В подготовке доклада принимали участие н.с. Татарина Л.В. и с.н.с. Максименко С.В. (к.б.н.) лаборатории клеточной и генной инженерии.

Работа выполнена при поддержке ФАНО РФ в соответствии с тематикой ГЗ 0600-2018-0017: "Исследование молекулярно-биологических аспектов биоинженерных технологий для совершенствования генетических ресурсов и создания новых селекционных форм сельскохозяйственных животных и птицы".