

СЕЛЕКЦИЯ ДОНОРСКИХ ООЦИТОВ СВИНЕЙ НА ОСНОВЕ ВСВ-ТЕСТА

Т.И. Кузьмина, Г.В. Мурза, О.П. Маташина, Н.О. Новикова

Всероссийский НИИ генетики и разведения сельскохозяйственных животных

Внедрение клеточных репродуктивных технологий в свиноводство следует рассматривать не только с точки зрения интенсификации селекционного процесса (получение эмбрионов *in vitro*, их трансплантация), а в большей мере, как разработку эффективных моделей для биомедицинских исследований, ксенотрансплантации, апробации фармакологических препаратов, совершенствования методов клеточной и генетической инженерии. Несмотря на то, что уже получено потомство клонированных животных, трансгенные свиньи, в том числе и с «gene knock out» («выключенные гены») эффективность этих технологий остается низкой [1,5]. Это объясняется неоднородностью популяции используемых донорских ооцитов и несовершенством систем дозревания. Необходимы углубленные фундаментальные исследования механизмов формирования зрелых яйцеклеток свиней для совершенствования методов культивирования незрелых ооцитов с целью получения из них сформировавшихся яйцеклеток, пригодных к оплодотворению и развитию доимплантационных эмбрионов.

Материал и методы. Исследования были выполнены согласно представленной структурно-логической схеме экспериментов (рисунок 1). Материалом для экспериментов служили ооциркумлюсные комплексы из антральных фолликулов свиней породы ландрас. Боенский материал

получали на мясокомбинате «Самсон» (Санкт-Петербург). Яичники без видимых признаков патологии, находящиеся на стадии фолликулярного роста, или с развитым желтым телом доставляли в лабораторию в термосе при температуре 35°C в течение 1,5-2 часов после овариоэктомии. Ооцит-кумуляные комплексы выделяли из фолликулов яичников аспирацией с помощью шприца с иглой или рассечением стенки фолликула, затем промывали 3 раза в среде TC-199 («Sigma», США), содержащей 5 мкг/мл гепарина и 50 мкг/мл гентамицина. В экспериментах использовали ооциты, выделенные из фолликулов разного диаметра (менее 3 мм, 3-5 мм, 5-8 мм), окруженные не менее чем 5-6 слоями кумулюсных клеток, с гомогенной ооплазмой и равномерной по ширине зоной пеллюцида. Стенки фолликулов получали из яичников после их кратковременной санации 70% спиртом, с использованием ножниц. Фолликулярную жидкость аспирировали из фолликулов диаметром 3-5 мм, с последующим центрифугированием при 1900×g в течение 30 минут. Затем жидкость фолликулов фильтровали через фильтр диаметром 1,2-1 мм и инактивировали при температуре 56 °C в течение 30 мин. Для проведения ВСВ - теста ооцит-кумуляные комплексы подвергали воздействию ВСВ (В-5388, Sigma) в концентрации 13 mM и экспозиции 60 минут. По истечении времени воздействия ВСВ ооцит-кумуляные комплексы разделяли визуально на две группы: ооциты с голубой окраской цитоплазмы - ВСВ(+) и неокрашенные ооциты без голубой окраски цитоплазмы ВСВ(-). Режим экстракорпорального созревания ооцитов, их оплодотворения и культивирования эмбрионов соответствовал методам, разработанным в лаборатории биологии развития ГНУ ВНИИГРЖ Россельхозакадемии [6]. Средой для культивирования служила NCSU 23, в которую добавляли 10 М.Е. хорионического гонадотропина человека, 10 М.Е. хорионического гонадотропина лошади, 10% фолликулярной жидкости (диаметр фолликулов 3- 5 мм), и стенки фолликулов (диаметр фолликулов 3- 5 мм). Статус хроматина ооцитов и эмбрионов оценивали по методу Tarkowsky [4].

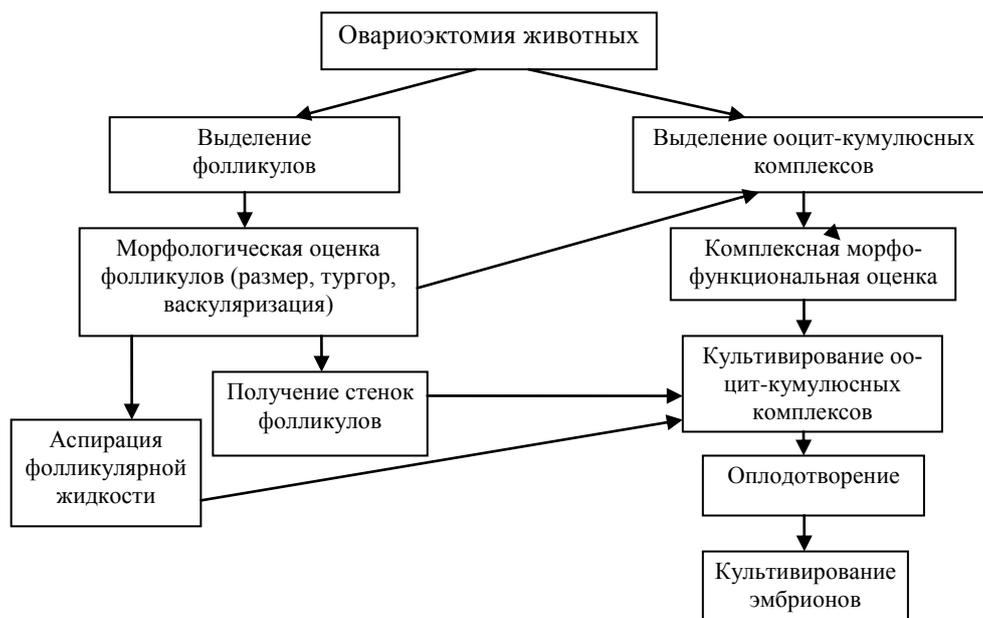


Рисунок 1 – Структурно-логическая схема экспериментов

Результаты и обсуждение. Применение в качестве зонда для прижизненного тестирования ооцитов бриллиантового кристаллического красителя (brillant cresyl blue - ВСВ) – индикатора активности глюкоза-6-фосфат-дегидрогеназы (G6PDH) обеспечивает возможность использования отобранных клеток для дальнейшего культивирования ооцитов, их оплодотворения и получения эмбрионов. ВСВ детерминирует интрацеллюлярную активность G6PDH, которая играет важную роль в клеточном росте, являясь ключевым ферментом пентозо-фосфатного цикла. Активность фермента возрастает в растущем ооците, к моменту завершения роста его активность снижается. Отсутствие токсичности данного красителя при его использовании в качестве теста при определении уровня G6PDH была показана на ооцитах овец, в зависимости от их размера, а также при определении компетенции к мейотическому дозреванию ооцитов свиней [2, 3]. В наших исследо-

ваниях проанализировано 826 ооцит-кумулюсных комплексов, выявлена гетерогенность популяции ооцитов по ВСВ - тесту в фолликулах разного диаметра (рис.2). Так, при анализе ооцитов, выделенных из фолликулов диаметром менее 3мм, было обнаружено, что процент окрашенных ооцитов составляет 71% (n=260), а неокрашенных - 29% (n=107). Не было обнаружено достоверных различий между числом ВСВ (+) и ВСВ(-) ооцитов, выделенных из фолликулов диаметром 3-5 мм и более 5 мм, их доля составила 86% (n=215;179, соответственно). Таким образом, обнаружено, что с увеличением диаметра фолликула в них достоверно увеличивается число клеток, завершивших фазу роста (таблица 1).

Таблица 1 – ВСВ-диагностика ооцитов свиней, выделенных из фолликулов разного диаметра

№ ооцитов	Диаметр фолликула	Число ооцитов ВСВ(+) n (%)	Число ооцитов ВСВ(-) n (%)
367	< 3мм	260(71) ^a	107(29)
251	3-5мм	215(86) ^b	36(14)
208	> 5мм	179(86) ^c	29(14)

Достоверность различия a,b; a, c P<0,01 (критерий χ -квадрат).

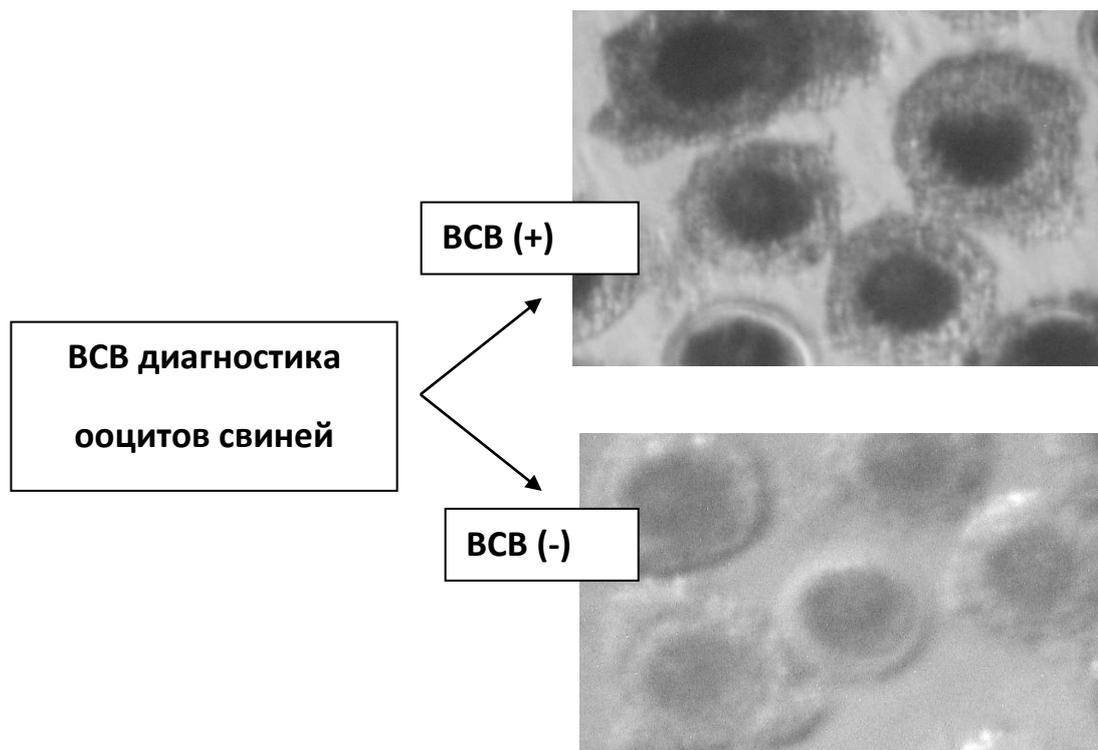


Рисунок 2 – Селекция популяции ооцитов свиней на основе ВСВ-теста

Ооцит-кумулюсные комплексы, оцененные с помощью ВСВ-теста, культивировали 44 часа, а затем оплодотворили. Анализ полученных эмбрионов проводили на разных стадиях развития (от 2-клеточных до морул и бластоцист). При этом оценивали следующие показатели: компактность

клеток; правильность формы эмбриона; отклонения в размере клеток; цвет и структура; наличие больших везикул; присутствие экструдированных элементов клеток; диаметр; форма зоны пеллюцида; наличие фрагментов клеток, фрагментация цитоплазмы; несоответствие числа бластомеров количеству ядер; эмбрионы с пикнотическими ядрами в бластомерах.

В результате проведенных исследований обнаружено, что после оплодотворения ооцитов, оцененных как ВСВ(-), т.е. женских гамет, не завершивших фазу роста, 19% ооцитов развились в эмбрионы, однако лишь 7% из них продвинулись в своем развитии и достигли через 144 часа стадий поздних морул и бластоцист (таблица 2).

Таблица 2 – Развитие доимплантационных эмбрионов свиней, полученных из ВСВ (+) и ВСВ(-) – ооцитов

Система культивирования	ВСВ - тест	Число ооцитов (n)	% (n) (раздробившихся)	% (n) эмбрионов на стадиях морулы, бластоцисты (144 часа)
NCSU 23+ *Гормоны + 10% **ФЖ + ***СФ	-	112	19 (21/112) ^a	7 (8/112) ^c
NCSU 23+ *Гормоны + 10% **ФЖ + ***СФ	+	109	52 (57/109) ^b	38 (41/109) ^d

Достоверность различия сравниваемых значений (критерий χ -квадрат): a,b;c,d P<0,001. NCSU 23 – синтетическая питательная среда, * гормоны – 10 М.Е. хорионический гонадотропин человека + 10 М.Е. хорионический гонадотропин лошади, ** ФЖ - фолликулярной жидкости (диаметр фолликулов 3- 5 мм), *** СФ - стенка фолликулов (диаметр фолликулов 3- 5 мм).

В группе ооцитов, завершивших перед оплодотворением свой рост - ВСВ(+), показатели оплодотворяемости оказались значительно выше, а процент дробящихся составил 52%, при дальнейшем культивировании 38% эмбрионов достигли завершающих стадий доимплантационного развития.

На основе использования маркера активности фермента глюкозо-6-фосфат дегидрогеназы - бриллиантового кристаллического красителя проведен мониторинг исходной популяции ооцитов свиней для прогнозирования их способности к дальнейшему созреванию и оплодотворению *in vitro*. Выявлена гетерогенность исходной популяции ооцитов свиней, выделенных из фолликулов разного диаметра на основании ВСВ теста. Показана высокая эффективность ВСВ- тестирования донорских ооцитов свиней, в результате которой значительно увеличился процент эмбрионов на завершающих стадиях доимплантационного развития.

Литература

1. Mayuko Kurome. Production of Transgenic-clone Pigs by the Combination of ICSI-mediated Gene Transfer with Somatic / Mayuko Kurome // Cell Nuclear Transfer Transgenic Research (2006) 15:229–240.
2. Roca, J. Selection of immature pig oocytes for homologous in vitro penetration assays with the brilliant cresyl blue test / J. Roca // Reproduction, Fertility and Development, 1998, 10, 479-486.
3. Rodriguez-Gonzalez, E. Selection of prepubertal goat oocytes using the brilliant cresyl blue test / E. Rodriguez-Gonzalez, M. Lopez-Bejar, E. Velilla & M. T. Paramio // Theriogenology, 2002, 57, 1397-1409.
4. Tarkowski, A. An air-drying method for chromosomal preparation from mouse eggs / A. Tarkowski // Cytogenetic. 1966. V. 1. P. 394-400.
5. Yoichi Takahagi. Production of α 1,3-galactosyltransferase gene knockout pigs expressing both human decay-accelerating factor and N-acetylglucosaminyltransferase III / Yoichi Takahagi // ,2003,Mol. Repr and Dev, V. 71, Issue 3, P.331-338.
6. Кузьмина, Т. Методы получения эмбрионов свиней in vitro / Т. Кузьмина, Х. Альм, Х. Торнер // С.-П. Пушкин, 2008, 36с.