

## ОПТИМИЗАЦИЯ ПРОТОКОЛА ГОРМОНАЛЬНОЙ ОБРАБОТКИ МЫШЕЙ С ЦЕЛЬЮ ВЫЗЫВАНИЯ СУПЕРОВУЛЯЦИИ

Е.С. Савченко\*, Н.С. Огнева, С.В. Максименко, М.М. Скрипкина, Н.В. Петрова

ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий  
Федерального медико-биологического агентства России»

143442, Российская Федерация, Московская обл., Красногорский р-н, п. Светлые горы, владение 1

Гормональная обработка мышей с использованием гонадотропина сыворотки жеребой кобылы (ГСЖК) и хорионического гонадотропина человека (ХГч) считается «золотым стандартом» в процедуре вызывания суперовуляции. Несмотря на применение одних и тех же доз, эффект от использования препаратов разных производителей может отличаться. Так, нами было показано, что применение препаратов ГСЖК Синхростим 500 («Ceva Sante Animale», Франция) и Сергон («Биовета», Чехия) позволяет получить с одной особи ~25 эмбрионов при дозировке гормона 5 МЕ, тогда как в случае Фоллимага («Мосагроген», Россия) рабочая дозировка не была найдена. Сопоставимый с Синхростимом 500 и Сергоном результат был получен в случае применения комбинированного препарата Менопур («Ферринг», Германия). Исследования влияния возраста мышей на гормональный ответ организма показали, что наиболее эффективным является использование мышей в возрасте 3–4 недели, когда при минимальной лекарственной нагрузке мы получаем достаточное количество жизнеспособных эмбрионов.

**Ключевые слова:** гонадотропин сыворотки жеребой кобылы, хорионический гонадотропин человека, суперовуляция, яйцеклетки, трансгенез, мыши, эмбрионы

**Конфликт интересов:** авторы заявили об отсутствии конфликта интересов.

**Для цитирования:** Савченко Е.С., Огнева Н.С., Максименко С.В., Скрипкина М.М., Петрова Н.В. Оптимизация протокола гормональной обработки мышей с целью вызывания суперовуляции. *Биомедицина*. 2020;16(3):48–53. <https://doi.org/10.33647/2074-5982-16-3-48-53>

Поступила 17.06.2020

Принята после доработки 29.06.2020

Опубликована 10.09.2020

## OPTIMIZING THE HORMONAL MICE TREATMENT PROTOCOL TO INDUCE SUPEROVULATION

Elena S. Savchenko\*, Nastasya S. Ogneva, Sergey V. Maksimenko,  
Maria M. Skripkina, Natalya V. Petrova

Scientific Center of Biomedical Technologies of the Federal Medical and Biological Agency of Russia  
143442, Russian Federation, Moscow region, Krasnogorsk district, Svetlye gory village, building 1

Mice treatment with pregnant mare gonadotropin serum (PMGS) in combination with human chorionic gonadotropin (hCG) is considered to be the “golden standard” of the induced superovulation procedure. The effect of administering the same doses may differ depending on the manufacturer of the preparation. According to our results, the use of PMGS produced by Synchrostim 500 (Ceva Sante Animale, France) and Sergon (Bioveta, Czech Republic) at a hormone dose of 5ME allows ~25 embryos to be obtained from one female. At the same time, the working dose of Follimagum (Mosagrogen, Russia) was not determined. The result comparable with that of Synchrostim 500 and Sergon was achieved using a composite drug Menopur (Ferring, Germany). The study of the influence of mice age on the hormonal response showed 3–4 weeks to be the most productive age, when the maximal number of viable embryos was obtained under a minimal external invasion.

**Keywords:** pregnant mare gonadotropin serum, human chorionic gonadotropin, superovulation, eggs, transgenesis, mice, embryos

**Conflict of interest:** the authors declare no conflict of interest.

**For citation:** Savchenko E.S., Ogneva N.S., Maksimenko S.V., Skripkina M.M., Petrova N.V. Optimizing the Hormonal Mice Treatment Protocol to Induce Superovulation. *Journal Biomed.* 2020;16(3):48–53. <https://doi.org/10.33647/2074-5982-16-3-48-53>

Submitted 17.06.2020

Revised 29.06.2020

Published 10.09.2020

## Введение

Современные технологии получения трансгенных мышей предполагают использование большого количества эмбрионов на ранних стадиях развития [1, 4]. Суперовуляция — процедура гормональной обработки животных с целью вовлечения большого количества фолликулов в рост и последующую овуляцию [10, 13] позволяет получить от одной особи существенно большее количество эмбрионов, нежели в естественном цикле, что позволяет сократить количество животных в эксперименте [7]. Для увеличения количества овулирующих фолликулов в классической схеме используют последовательное введение препаратов: гонадотропина сыворотки жеребой кобылы (ГСЖК), который используется для имитации эффекта созревания ооцитов эндогенным фолликулостимулирующим гормоном (ФСГ), и хорионического гонадотропина человека (ХГч) для имитации эффекта индукции овуляции лютеинизирующим гормоном (ЛГ) [1, 10] — с последующей подсадкой к фертильным самцам.

**Целью** данного исследования является сравнение нескольких гормональных препаратов на предмет эффективности использования при подготовке самок-доноров, а также подбор оптимальных концентраций при использовании мышей разного возраста.

## Материалы и методы

В эксперименте использовались самки гибридных мышей линии C57Bl/6Y x CBA/Y

(F1) в возрасте 3–4 недели и 1,5–2 мес., полученные из филиала «Столбовая» ФГБУН НЦБМТ ФМБА России. Животные содержались в закрытой системе при световом режиме 12/12 ч, со свободным доступом к еде и воде. Для вызывания суперовуляции самкам внутрибрюшинно вводили препарат ГСЖК или комбинированный препарат, содержащий лютеинизирующий и фолликулостимулирующий гормоны, а через 47–50 ч — ХГч, и подсаживали к плодовитым самцам. Утром проверяли самок на наличие копулятивной пробки, что свидетельствовало об успешном покрытии самки. Забой самок производили дислокацией шейных позвонков, а затем хирургически удаляли яйцеводы. Извлечение эмбрионов из ампулы яйцевода производили в среде M2 (Sigma-Aldrich), а затем их переносили на культивирование в среду M16 (Sigma-Aldrich) в CO<sub>2</sub> инкубатор при постоянной температуре 37°C и концентрации CO<sub>2</sub> 5%.

## Результаты и их обсуждение

### *Подбор препаратов для стимуляции роста и развития фолликулов*

Для вызывания суперовуляции нами были выбраны следующие препараты ГСЖК: Фоллимаг («Мосагроген», Россия), Синхростим 500 («Ceva Sante Animale», Франция) и Сергон («Биовета», Чехия), а также комбинированные гормональные препараты Менопур («Ферринг», Германия), содержащий ФСГ и ЛГ в соотношении 1:1, и Перговерис («Мерк», Швейцария), содержащий ФСГ и ЛГ в со-

отношении 1:2. Препараты вводились самкам в возрасте 3–4 недели по 5 МЕ/мышь внутривбрюшинно (активность комбинированных препаратов рассчитывалась по активности ФСГ). Результаты исследования представлены в табл. 1.

Анализ полученных данных показал, что применение препаратов ГСЖК Сергона и Синхростима в дозе 5 МЕ способствует активному росту и созреванию фолликулов с последующим получением оптимального количества жизнеспособных эмбрионов, пригодных для дальнейших манипуляций (микроинъекций генетической конструкции в мужской пронуклеус и пр.). Сопоставимые результаты были получены в случае использования комбинированного гормонального препарата Менопур, что показывает возможность его применения для стимуляции суперовуляции у мышей вместо ГСЖК в аналогичной дозировке.

Однако в случае с Фоллимагом наблюдается совершенно иная картина: при обработке мышей в дозе 5 МЕ количество полученных зигот в среднем составляет всего 3,1 эмбрион/мышь. Более того, в ходе экспериментов с применением различных дозровок Фоллимага, которые соответствовали рабочим дозировкам других препаратов, концентраций, позволяющих получить до-

статочное количество эмбрионов, выявлено не было. Применение комбинированного препарата Перговерис также значимых результатов не показало.

### *Подбор оптимальной дозы для мышей разного возраста*

Анализ литературных данных показал, что в экспериментах могут быть использованы самки-доноры различного возраста, что может отразиться на эффективности применения гормональных препаратов, т. е. количестве и качестве полученных эмбрионов [5, 13]. Результат гормональной стимуляции также зависит от массы животного и его физического состояния: мыши с нарушениями метаболизма продуцируют эмбрионы со сниженной жизнеспособностью и потенциями к развитию [3].

Для экспериментов были отобраны 3 группы мышей линии C57Bl/6Y x CBA/Y (F1) в возрасте 3–4 недели, 1,5 мес. и 2 мес. соответственно. Животные были обработаны гормональным препаратом Синхростим 500 в дозе 5, 7,5 и 10 МЕ. Результаты эксперимента представлены в табл. 2.

Из табл. 2 видно, что ГСЖК в дозе 5 МЕ эффективно работает на мышах в возрасте до 1,5 мес., тогда как более взрослым мышам требуются повышенные дозы препарата, чтобы получить сопоставимый

**Таблица 1.** Количество жизнеспособных эмбрионов, полученных при обработке различными гормональными препаратами

**Table 1.** The number of viable embryos following treatment with various drugs

Препарат	Фоллимаг	Синхростим	Сергон	Менопур	Перговерис
Кол-во жизнеспособных эмбрионов, среднее на 1 самку	3,1	24,6	25,8	24,5	8,1

**Таблица 2.** Количество жизнеспособных эмбрионов в зависимости от возраста мышей и дозировки препарата ГСЖК Синхростим 500

**Table 2.** The number of viable embryos related to mice age and the dose of PMGS Synchrostim 500

Возраст животных	Кол-во эмбрионов при различной дозировке препарата Синхростим 500		
	5 МЕ	7,5 МЕ	10 МЕ
3–4 недели	24,6	25,8	28,4
1,5 мес.	25,9	24,3	22,4
2 мес.	12,8	20,4	22,5

результат. Наилучший результат был получен в случае применения ГСЖК в дозировке 10 МЕ на мышах в возрасте 3–4 недели. Однако многие исследователи отмечают, что предшествующая гормональная обработка может влиять на качество полученных эмбрионов и их способности к дальнейшему развитию [6, 9, 11, 12]. Так, было показано, что повышенные дозы гормонов (7,5–10 МЕ) при вызывании суперовуляции могут негативно влиять на созревание ооцитов [9], их качество, а также уровень экспрессии некоторых генов, что может стать причиной снижения процента имплантации, повышенной эмбриональной смертности и замедления развития эмбрионов [11]. Было показано, что суперовуляция влияет на уровень экспрессии ДНК метилтрансфераз в ядрах предимплантационных эмбрионов, что приводит к снижению общего уровня метилирования в зиготе, а также влияет на экспрессию некоторых генов, в т. ч. и генов, связанных с ранним развитием эмбриона [2, 11, 12], по сравнению с контрольной группой, эмбрионы от которой были получены в естественном цикле. Это влечёт за собой изменение статуса метилирования генома эмбриона и непосредственно влияет на его способности к развитию [2, 12], в частности на его способность имплантироваться в эндометрий матки. Микроманипуляции с зиготами и ранними эмбрионами являются травматичными процедурами, однако было показано, что именно гиперстимуляция оказывает наибольшее влияние на изменение статуса метилирования генома эмбриона [2], что может стать фатальным для дальнейшего развития. Исследователи связывают это явление с тем, что геном ранних эмбрионов очень

активен [12] и гораздо более восприимчив к эпигенетическим факторам, что приводит к изменению активности генов. Также было показано [8], что изменения уровня метилирования генома зиготы, вызванные суперовуляцией, могут быть сохранены в геноме потомков, в частности в половых клетках самцов, отстоящих на 2 поколения. Таким образом, применение повышенных доз гормонов для вызывания суперовуляции нежелательно, т. к. может отразиться на количестве и качестве потенциального потомства. Мы полагаем, что наиболее оптимально использовать в экспериментах животных не старше 1,5 мес., отдавая предпочтение мышам в возрасте 3–4 недели. Такая схема позволяет получить максимальный выход жизнеспособных эмбрионов при минимальных внешних воздействиях [2, 7].

### **Заключение**

Получение трансгенных мышей — это трудоёмкий и весьма сложный процесс, эффективность которого зависит от многих факторов, но во многом определяется качеством «первичного материала», т. е. ранних эмбрионов, в которых и будет происходить редактирование генома. Вызывание суперовуляции с помощью гормональных препаратов — важный этап для получения достаточного количества жизнеспособных эмбрионов и дальнейших манипуляций [4, 10]. Однако не стоит забывать, что любое вмешательство в живой организм может привести к непредсказуемым последствиям для развития эмбриона. Поэтому оптимизация протокола получения предимплантационных эмбрионов — одна из перспективных задач современной эмбриологии.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ | REFERENCES

- Behringer R., Gertsenstein M., Nagy K.V., Nagy A. Administration of Gonadotropins for Superovulation in Mice. *Cold Spring Harb. Protoc.* 2018;2018(1):24–27. DOI: 10.1101/pdb.prot092403.
- Chen X., Huang Y., Huang H., et al. Effects of superovulation, in vitro fertilization, and oocyte *in vitro* maturation on imprinted gene Grb10 in mouse blastocysts. *Arch. Gynecol. Obstet.* 2018;298(6):1219–1227. DOI: 10.1007/s00404-018-4905-3.
- Fabian D., Babeřová J., Čikoř Š., Šeřčíková Z. Overweight negatively affects outcome of superovulation treatment in female mice. *Zygote*. 2017;25(6):751–759. DOI: 10.1017/S0967199417000648.
- Hasegawa A., Mochida K., Inoue H., et al. High-Yield Superovulation in Adult Mice by Anti-Inhibin Serum Treatment Combined with Estrous Cycle Synchronization. *Biol. Reprod.* 2016;94(1):21. DOI: 10.1095/biolreprod.115.134023.
- Hoogenkamp H., Lewing P. Superovulation in mice in relation to their age. *Vet. Q.* 1982;4(1):47–48. DOI: 10.1080/01652176.1982.9693838.
- Huffman S.R., Pak Y., Rivera R.M. Superovulation induces alterations in the epigenome of zygotes, and results in differences in gene expression at the blastocyst stage in mice. *Mol. Reprod. Dev.* 2015;82(3):207–217. DOI: 10.1002/mrd.22463.
- Kolbe T., Sheety S., Walter I., Palme R., Rülcke T. Impact of superovulation and mating on the wellbeing of juvenile and adult C57BL/6N mice. *Reprod. Fertil. Dev.* 2016;28(7):969–973. DOI: 10.1071/RD14372.
- Stouder C., Deutsch S., Paoloni-Giacobino A. Superovulation in mice alters the methylation pattern of imprinted genes in the sperm of the offspring. *Reprod. Toxicol.* 2009;28(4):536–541. DOI: 10.1016/j.reprotox.2009.06.009.
- Taiyeb A.M., Muhsen-Alanssari S.A., Dees W.L., et al. Improvements in oocyte competence in superovulated mice following treatment with cilostazol: Ovulation of immature oocytes with high developmental rates. *Biochem. Pharmacol.* 2017;137:81–92. DOI: 10.1016/j.bcp.2017.04.019.
- Takeo T., Nakagata N. Superovulation using the combined administration of inhibin antiserum and equine chorionic gonadotropin increases the number of ovulated oocytes in C57BL/6 female mice. *PLoS One*. 2015;10(5):e0128330. DOI: 10.1371/journal.pone.0128330.
- Uysal F., Ozturk S., Akkoyunlu G. Superovulation alters DNA methyltransferase protein expression in mouse oocytes and early embryos. *J. Assist. Reprod. Genet.* 2018;35(3):503–513. DOI: 10.1007/s10815-017-1087-z.
- Yu B., Smith T.H., Battle S.L., Ferrell S., Hawkins R.D. Superovulation alters global DNA methylation in early mouse embryo development. *Epigenetics*. 2019;14(8):780–790. DOI: 10.1080/15592294.2019.1615353.
- Zudova D., Wyrobek A.J., Bishop J., Marchetti F. Impaired fertility in T-stock female mice after superovulation. *Reproduction*. 2004;128(5):573–581. DOI: 10.1530/rep.1.00333.

## СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ | INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

**Савченко Елена Сергеевна\***, ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий Федерального медико-биологического агентства России»;  
e-mail: [savelaine@gmail.com](mailto:savelaine@gmail.com)

**Огнева Настасья Сергеевна**, ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий Федерального медико-биологического агентства России»;  
e-mail: [ognevanastya@mail.ru](mailto:ognevanastya@mail.ru)

**Максименко Сергей Васильевич**, к.б.н., ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий Федерального медико-биологического агентства России»;  
e-mail: [vx136@rambler.ru](mailto:vx136@rambler.ru)

**Elena S. Savchenko\***, Scientific Center of Biomedical Technologies of the Federal Medical and Biological Agency of Russia;  
e-mail: [savelaine@gmail.com](mailto:savelaine@gmail.com)

**Nastasya S. Ogneva**, Scientific Center of Biomedical Technologies of the Federal Medical and Biological Agency of Russia;  
e-mail: [ognevanastya@mail.ru](mailto:ognevanastya@mail.ru)

**Sergey V. Maksimenko**, Cand. Sci. (Biol.), Scientific Center of Biomedical Technologies of the Federal Medical and Biological Agency of Russia;  
e-mail: [vx136@rambler.ru](mailto:vx136@rambler.ru)

**Скрипкина Мария Михайловна**, ФГБУН  
«Научный центр биомедицинских технологий  
Федерального медико-биологического агентст-  
ва России»;  
**e-mail:** [skripkina.fmba@gmail.com](mailto:skripkina.fmba@gmail.com)

**Maria M. Skripkina**, Scientific Center of  
Biomedical Technologies of the Federal Medical  
and Biological Agency of Russia;  
**e-mail:** [skripkina.fmba@gmail.com](mailto:skripkina.fmba@gmail.com)

**Петрова Наталья Владимировна**, ФГБУН  
«Научный центр биомедицинских технологий  
Федерального медико-биологического агентст-  
ва России»;  
**e-mail:** [m-sklad@ya.ru](mailto:m-sklad@ya.ru)

**Natalya V. Petrova**, Scientific Center of Biomedical  
Technologies of the Federal Medical and Biological  
Agency of Russia;  
**e-mail:** [m-sklad@ya.ru](mailto:m-sklad@ya.ru)

---

\* Автор, ответственный за переписку / Corresponding author