

## ВИКОРИСТАННЯ БІЛИХ МИШЕЙ ЯК БІОЛОГІЧНОЇ МОДЕЛІ В ПРОВЕДЕННІ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ ДЛЯ ТЕСТУВАННЯ ГОРМОНАЛЬНИХ ПРЕПАРАТІВ

*О. Б. Андрушко, М. М. Шаран, С. Б. Корнят, А. Р. Корбецький,  
Ю. Р. Балабан, О. Дудчак, З. С. Топурко*

Інститут біології тварин УААН

*Вивчено вплив дії окремих гормональних препаратів, які використовують для індукції множинної овуляції у лабораторних тварин, на функцію яєчників, ріст фолікулів з наступною морфологічною оцінкою якості одержаних ооцитів і ембріонів білих мишей після культивування.*

**Ключові слова:** БІЛІ МИШІ, ГОРМОНАЛЬНІ ПРЕПАРАТИ, МНОЖИННА ОВУЛЯЦІЯ, ЕМБРІОНИ.

При інтенсивних біотехнологіях відтворення тварин застосовують метод суперовуляції, який забезпечує розвиток додаткових фолікулів у яєчниках шляхом введення самкам гонадотропних гормонів. Найбільш вдалою біологічною моделлю для стандартизації гормональних препаратів є білі мишки *Mus musculus* L, яєчники і матка яких дуже чутливі до введення гормональних стимуляторів [1].

Процеси овуляції з подальшим заплідненням найбільш детально вивчені на прикладі мишей [2].

Для викликання множинної овуляції в лабораторних тварин переважно використовують гормон сироватки жеребової кобили (ГСЖК) у поєднанні з хоріогонічний гормон (ХГ), а лише в окремих випадках застосовують гіпофізарні препарати фолікулостимулюючий гормон (ФСГ) [2]. Оптимальні дози цих препаратів і інтервали їх введення наведені в табл. 1. Для мишей інтервал між ін'єкціями препаратів має складати 42–52 години. Якщо він менший, то часу для дозрівання фолікулів недостатньо. При збільшенні інтервалу вище 52 годин суперовуляція стає малоконтрольованою внаслідок виділення гіпофізом лютеїнізуючого гормону. Велике значення має і час введення препарату протягом доби. Препарат ГСЖК самкам мишей вводиться переважно в 14–15 годині, а ХГ рівно через дві доби. ГСЖК вводять підшкірно.

У самок мишей рівень суперовуляції максимальний у ранньому віці [3]. У цей період в яєчниках самок є найбільша кількість антральних фолікулів, здатних реагувати на гормональну обробку [4]. У віці 3–5 тижнів у мишей виникає хвиля атрезії фолікулів.

Доля спарованих самок залежить від багатьох факторів: якості і схеми застосування гормональних препаратів, активності самців, віку і генетичних особливостей. Так, у мишей високореактивної лінії DD кількість розвинутих ембріонів після введення гонадотропних препаратів у 2–4 рази вища, ніж у тварин ліній СВА чи BALB. Є лінії мишей які не реагують на гормональну обробку внаслідок малої кількості в яєчниках рецепторів до гонадотропінів [5].

У практичній роботі найчастіше застосовують не нативну сироватку жеребних кобил (СЖК), а очищений ліофілізований ГСЖК з назвою відповідної фірми виробника [6]. Якість гормональних препаратів, які будуть використані для індукції множинної овуляції, має вирішальне значення для результатів поліовуляції та ефективності роботи в даному напрямку. Тому виникає необхідність проведення попередніх досліджень з визначення біологічної активності випробовуваних стимулюючих засобів. Для цього існують відповідні тести в різних модифікаціях, за якими проводяться контрольні визначення: загальної гонадотропної активності препаратів ГСЖК; визначення ФСГ-активності, ЛГ-активності

гормональних препаратів. Тести мають бути специфічними і в межах «зони фаз» мають лінійну залежність у дії від кількості введеного препарату [7].

Виходячи з вищевикладеного метою роботи було виконання наступних завдань:

— експериментальна перевірка на білих мишках загальної (сумарної) гонадотропної активності препаратів сироваткового гонадотропіну ГСЖК та гіпофізарного гонадотропіну ФСГ, які будуть використані при проведенні наступного етапу досліджень для індукції множинної овуляції лабораторних тварин;

— вивчення впливу досліджуваних гормональних препаратів на функціональний стан органів розмноження білих мишок після індукції суперовуляції;

— одержання та морфологічна оцінка якості вимитих ооцитів і ембріонів;

— створення умов для забезпечення збереження життєздатності ембріонів;

— розробка рекомендацій за результатами досліджень.

## Матеріали і методи

Для проведення експериментальних досліджень використано гормональні препарати, які здатні індукувати суперовуляцію: в яєчниках самок ГСЖК, ФСГ, хоріогонічний гормон (ХГ). При підборі препаратів враховували, що ФСГ і ХГ володіють майже однаковим суперовулюючим впливом на яєчники та ефективніші, ніж ГСЖК за кількістю вимитих життєздатних ембріонів. Однак ХГ у тваринництві рідко використовується, а ГСЖК має переваги внаслідок одноразового введення. Головна відмінність гонадотропінів полягає в тривалості їх біологічного впливу після введення. Для ГСЖК тривалість напіврозпаду в крові становить 5 діб, для ФСГ — 6 годин. Тому ГСЖК вводять одноразово, а ФСГ — багаторазово, з інтервалом 12 годин, протягом 4 днів.

Для проведення досліджень було застосовано препарат ГСЖК «Серогонадотропін» польського виробництва. Визначення активності даного препарату проводили на нестатевозрілих білих мишах живою масою 8–9 г. Дози ГСЖК на одну мишу були наступні: 1,25; 2,5; 5,0; 10,0; 20,0; 40,0; 80,0; 160,0; 320,0 мкг. Кожну з цих доз вводили 5-ти мишкам згідно розробленої методики та схеми лабораторних досліджень [8]. Одержання вищезгаданих доз гонадотропного препарату, попередньо зважували загальну масу (3200 мкг) і розчиняли в 6 мл 0,9 % розчині хлористого натрію. З даного розчину брали 3 мл препарату, в яких містилося 1600 мкг (або в розрахунку на одну мишку 320,0 мкг ГСЖК) і переносили в другу пробірку. В першу і другу пробірки додавали по 3 мл фізрозчину. З другої пробірки переносили 3 мл в третю і т. д., додаваючи в кожную пробірку по 3 мл фізрозчину. Із пробірки з останнім розведенням 3 мл розчину виливали. Таким чином ряд пробірок містили вищевказані дози серогонадотропіну з розрахунку на 5 мишей. Кожній мишці вводили у дозі 0,2 мл ГСЖК один раз в день підшкірно, в ділянку спини. За три ін'єкції 5-ти мишам ввели всі 3 мл розчину ГСЖК. На четвертий день після першої ін'єкції препарату проводили забій мишей. Для встановлення реакції статевих органів на дію гонадотропінів відпрепарувували матку і яєчники та зважували їх на торсійній вазі. Контролем служили миші-аналоги за віком і масою. В результаті досліджень встановлено, що препарат «Серогонадотропін» біологічно активний, володіє комплексною фолікулостимулюючою та лютеїнізуючою дією, та має вплив на статеву систему, викликаючи морфологічні і фізіологічні зміни в яєчниках та матці білих мишей.

Активність препарату ФСГ чеського виробництва тестували на самках білих мишей масою 6–8 г, у віці 21–28 днів. Активність даного препарату виміряли в мишиних одиницях (МО). Мишиною одиницею називається мінімальна кількість гормону в препараті, що викликає у 50 % нестатевозрілих самок мишей у віці 20–28 днів трикратне збільшення маси матки та розкриття піхви. Тестування проводили в модифікації, яка передбачає проведення лише однієї ін'єкції по 0,2 мл, препарату розведеного в фізіологічному розчині. Тривалість реакції згідно даної модифікації тесту становила 76 годин. Ефективність реакції оцінювали за масою матки. Найменшим вважали збільшення до 30–35 мг (+), високим — більше 60 мг (+++).

З метою індукції множинної овуляції, одержання ооцитів та ембріонів в умовах віварію Інституту біології тварин УААН було відібрано 18 статевозрілих самок білих мишей-аналогів за віком (28–30 днів) та живою масою (10,3–11,7 г) поділено на 3 групи: 2 дослідні та контрольну, (n=6). Умови утримання і годівлі були однакові для мишей всіх груп. Добова потреба кормів для однієї дорослої мишки складала в середньому 9,5–10 г змішаного зернового корму та 1–2 г овочів.

Мишкам першої дослідної групи для індукції множинної овуляції вводили препарат ГСЖК з подальшою ін'єкцією ХГ. Мишкам другої дослідної групи відповідно вводили препарат ФСГ та ХГ. Мишок контрольної групи гормональними препаратами не обробляли.

Дослідження проводили за наступною схемою (табл. 1)

Таблиця 1

Дні	Групи тварин	Маніпуляції
Перший	1 дослідна 2 дослідна	ГСЖК — 0,2 мл (5–10 Ю) ФСГ — 0,2 мл (5–10 ОД)
Третій	1 і 2 дослідні	ХГ — 0,1 мл (10–20 ОД), Через 2 год парування
Четвертий	Контрольна, 1 і 2 дослідні	Дослідження мишей на наявність копулятивних пробок
Сьомий	1 і 2 дослідні	Одержання ооцитів і ембріонів, їх морфологічна оцінка та культивування
Дев'ятий	1 і 2 дослідні	Морфологічна оцінка ембріонів після культивування

Після розтину мишок досліджували матку та яєчники, а також провели промивання яйцепроводів фосфатно-сольовим буферним середовищем Дюльбекко з додаванням 4 % бичачого сироваткового альбуміну згідно стандартної методики [9]. Оцінку якості ембріонів проводили за допомогою мікроскопа МБС-10 під збільшенням у 10–20 разів (загальний вигляд) і в 100 разів (для дослідження окремих бластомерів).

Після оцінки якості нативних мишиних ембріонів провели короткотривале культивування їх у стерильному боксі. Для цього одержані ембріони поміщали у культуральне середовище Дюльбекко з підвищеним вмістом фетальної сироватки (20–30 %) і ставили у спеціальний термостат на 48 годин при температурі +38 °С. Культивування ембріонів проводили в 0,2 мл поживного середовища на годинникових шкельцях, які поміщали у чашки Петрі, і витримували в ексикаторі з щільно притертою кришкою. Над середовищем створювали вологу газову атмосферу (5 % кисню, 5 % CO<sub>2</sub>, 90 % азоту) для підтримки необхідної буферності середовища. Після культивування ембріонів їх повторно оцінювали за морфологічними ознаками. Життєздатними вважали ті ембріони, які розвинулись у культуральному середовищі до стадії пізньої, розширеної або експансованої (вилупленої) бластоцист.

## Результати й обговорення

У результаті тестування біологічної активності препарату ФСГ встановлено позитивну реакцію всіх дослідних мишей після ін'єкції (табл. 2).

Таблиця 2

### Морфометричні показники матки мишок після стимуляції гонадотропінами

Показники	Групи тварин		
	Контрольна	1-а дослідна	2-а дослідна
Маса матки, мг	18,0±1,6	79,0±9,4***	64,0±10,2***
Маса мишей, г	9,0±1,1	9,06±0,9	9,84±1,0

Примітка. \*\*\* — p<0,001

Так, з п'яти дослідних мишей за показником (+++) прореагувало три мишки, в яких маса матки збільшилась у 3–4 рази у порівнянні з контролем. У двох решта дослідних мишей маса матки була збільшена відповідно до контролю у 2–2,5 раза. Таким чином,

обидва протестовані препарати ГСЖК та ФСГ володіють гормональною активністю і викликають множинну овуляцію в лабораторних тварин.

Після проведення гормональної обробки білих мишей згідно схеми досліджень та контакту з самцями копулятивний корок виявлено у всіх 6-ти самок мишей першої дослідної групи (ГСЖК+ХГ). Всі миші у цій групі адекватно прореагували на індукцію множинної овуляції і були спаровані. Аналогічну картину спостерігали також у мишей другої дослідної групи після обробки (ФСГ+ХГ). Однак, при цьому з 6-ти самок позитивно прореагували 5, що свідчить про меншу стимулюючу дію препарату ФСГ порівняно з ГСЖК. У мишей контрольної групи за цей проміжок часу було спаровано 2 самки. Ще одна мишка з цієї групи була спарована значно пізніше, через 12 днів від початку досліду.

Вимиті ембріони були оцінені морфологічно за класифікацією: відмінні (+ +), добрі (+), задовільні ( ± ) і незадовільні (–). У вимивному середовищі знаходили незапліднені яйцеклітини у стані дегенерації, які мали дещо зруйновану або неправильної форми цитоплазму. При цьому спостерігали набухання перивітелінового простору з гомогенним збільшенням цитоплазматичних тілець. Зокрема, відповідно по групах, було вимито ембріони відмінної, доброї і задовільної якості: контрольна група — всього 18, з яких 6 (++) , 9 (+), 3 (+-); перша дослідна група — всього 21, з яких 15 (++) , 5 (+), 1 (+-); друга дослідна група — всього 20, з яких 12 (++) , 7 (+), 1 (+-). Оцінювали ембріони від стадії восьми і більше бластомерів, оскільки ці стадії розвитку ембріонів вважаються найзручнішими для подальших маніпуляцій з ними в умовах *in vitro*.

Результати досліджень якості мишиних ембріонів за їх здатністю до розвитку *in vitro* після культивування свідчать про те, що найвищий відсоток (33,3) зниження морфологічної якості (повний розпад, або серйозні пошкодження більшої частини бластомерів) спостерігали в ембріонів самок білих мишей контрольної групи (табл. 3). Спроба культивувати пошкоджені ембріони була невдалою, жоден із них не розвинувся *in vitro*. В першій і другій дослідних групах відсоток ембріонів з морфологічними пошкодженнями був значно меншим і становив відповідно 19 і 20 %. Після культивування стадії бластоцисти досягло 66,7 % ембріонів контрольної групи мишей, що на 14,2 % і 13,3 % менше, ніж від мишей першої і другої дослідних груп.

Таблиця 3

Збереження ембріонів мишей після культивування в умовах термостату.

№ н/п	Досліджувані показники	Групи мишей		
		Контрольна (n=3)	I дослідна (n=6)	II дослідна (n=5)
1.	Всього поставлено ембріонів на культивування, шт..	18	21	20
2.	Кількість ембріонів з морфологіч — ними пошкодженнями, n-%	6–33,3	4–19,0	4–20,0
3.	Ембріони, що розвинулись до стадії бластоцист, шт.	12	17	16
4.	Збереження ембріонів після культивування, %	66,7	80,9	80,0

Життєздатність ембріонів, одержаних від мишей дослідних груп після культивування була на досить високому рівні і становила приблизно 80 %. Морфологічний стан ембріонів, які досягли стадії бластоцисти не відрізнявся від нативних ембріонів, у них чітко спостерігалася бластопорожнина, бластула заповнена тонким шаром бластомерів і щільнішою масою, яка виступала у бластопорожнину.

На основі проведених досліджень можна зробити висновок, що для лабораторної роботи з ембріонами у практиці технології нехірургічної трансплантації ембріонів тварин є обов'язковим виконання наступних основних етапів робіт: підготовка донорів, (синхронізація статевої охоти); індукція суперовуляції у донорів; вимивання ембріонів; оцінка їх життєздатності та пересадка або кріоконсервація.

## Висновки

1. Білі миші є зручним біологічним об'єктом для тестування гормональних препаратів.

2. В лабораторних умовах встановлено перевагу використання для індукції множинної овуляції у мишей препаратів ГСЖК у поєднанні з ХГ за класичною схемою над ФСГ.

3. У мишей після індукції множинної овуляції одержано більшу кількість повноцінних ембріонів.

*A. B. Andrushko, M. M. Sharan, S. B. Korniat, A. R. Korbetskyy, J. R. Balaban, W. O. Dudchak, Z. S. Topurko*

## **THE USE OF WHITE MICE AS A BIOLOGICAL MODEL IN EXPERIMENTS FOR TRAINING OF TESTING OF HORMONAL PREPARATIONS**

### **S u m m a r y**

The possibility of use the hormonal preparations of PMSG, FSH and HgG for induction of superovulation in white mice has been studied. In groups of mice under investigation after induction of multiple ovulation were recovered higher number of excellent quality embryos comparing to control group.

The work of such kind on laboratory animals can be used for preparation of students – biologists and future specialists in animal biotechnology reproduction.

The Institute of Animal Biology of the Academy of Agrarian Sciences of Ukraine

1. *Шаталов П. И., Желев В. З.* Гравогормон в животноводстве. — Москва. — Колос, 1975.

2. *Hogan B., Constantini F.* Manipulating the Mouse Embryo. A laboratory manual // Spring Harbor Laboratory. — 1986.

3. *Zarrow M. X., Wilson E. D.* The influence of age on superovulation in the immature rat and mouse // *Endocrinol.* — V. 69. — 1961.

4. *Gates A. H.* Maximizing yield and development uniformity of eggs // *Methods in Mammalian Embryology.* Freeman. — 1971.

5. *Спирова Д. Л.* Механизм действия генов контролирующих воспроизведение // *Генетика воспроизведения.* — Москва: Агропромиздат, 1987.

6. *Буркат В. П., Влізло В. В., Кравців Р. Й., Шаловило С. Г. та ін.* Довідник з репродуктивної біотехнології великої рогатої худоби. — Львів, 2004.

7. *Клинский Ю. Д.* Методические рекомендации по определению активности гонадотропина сыворотки жеребых кобыл (ГСЖК). Всесоюзный НИИ животноводства. — Дубровицы, 1984.

8. Получение и применение гонадотропинов СЖК и комплексных препаратов для стимуляции репродуктивной функции животных. / Розгони И. И., Смолянинов Б. В. и др. // *Методические рекомендации.* — Львов, 1982.

9. *Кривохарченко А. С., Бахитов К. И.* Влияние способа оттаивания эмбрионов мышей, замороженных сверхбыстрым методом на их жизнеспособность // *Онтогенез.* — 1992. — т.23. — № 1.