

Партеногенетическое развитие эмбрионов *Bos taurus* из ооцитов, созревших в различных системах культивирования

Т. И. Кузьмина¹✉

¹ Всероссийский научно-исследовательский институт генетики и разведения сельскохозяйственных животных – филиал федерального научного центра животноводства – ВИЖ имени академика Л. К. Эрнста, Пушкин, Россия

✉ E-mail: prof.kouzmina@mail.ru

Аннотация. Выявление факторов, детерминирующих приобретение донорскими ооцитами компетентности к партеногенетическому развитию, позволит разработать эффективный метод получения партеногенов для решения фундаментальных проблем регуляции активности генов в онтогенезе, создания гомозиготных линий эмбриональных стволовых клеток, совершенствования этапов технологии клонирования, моделирования сред для дозревания ооцитов *in vitro*. **Цель исследования** – оценить потенции ооцитов *Bos taurus*, созревших в различных системах культивирования, к индуцированному холодовым шоком партеногенезу. **Методы.** Для созревания ооцитов использовали системы культивирования следующего состава: 1 – ТС-199 с 10 % процентами фетальной бычьей сыворотки (ФБС), 50 мкг/мл эстрадиола, 10 мкг/мл лютеинизирующего гормона, 10 мкг/мл фолликулостимулирующего гормона; 2 – ТС-199 с 10 % эстральной сыворотки коров; 3 – ТС-199 с 50 % жидкости фолликулов (Ø 3–8 мм); 4 – ТС-199 с 50 % белков фолликулярной жидкости молекулярной массой 65 кДа; 5 – ТС-199 с 10 % ФБС, 1×10^6 клеток гранулезы на 1 мл среды; 6 – ТС-199 с 10 % ФБС и стенками фолликулов (Ø 6–8 мм); 7 – ТС-199 с 10 % ФБС, 1×10^6 клеток гранулезы на 1 мл среды и стенками фолликулов (Ø 6–8 мм). После 24 часов культивирования ооциты активировали холодовым шоком (экспозиция 20 минут, температура 0...–4 °С). **Результаты.** Доля эмбрионов на стадиях поздней морулы и бластоцисты из ооцитов, созревших в системе 7, составила 45 % (58/129), что оказалось значительно выше, чем в других системах: 1 – 28 % (39/141), $P < 0,05$; 2 – 31 % (42/137), $P < 0,05$; 3 – 25 % (33/133), $P < 0,01$; 4 – 18 % (25/139), $P < 0,001$; 5 – 31 % (41/132), $P < 0,05$; 6 – 33 % (43/129). Введение в среду созревания ооцитов эстрадиола или структурных компонентов антральных фолликулов способствовало увеличению доли партеногенов на доимплантационных стадиях развития (в том числе и бластоцисты) и снижению уровня дегенерированных эмбрионов. **Научная новизна.** Впервые проведен сравнительный морфологический анализ потенций к партеногенезу ооцитов коров, созревших в различных системах культивирования и индуцированных к партеногенезу холодовым шоком, предложены оптимальные системы созревания женских гамет *in vitro*. С учетом анализа полученных результатов рекомендовано для получения партеногенов путем активации холодовым шоком до момента индукции к партеногенезу ооциты коров культивировать в средах, дополненных 50 нг/мл эстрадиола или структурными компонентами антральных фолликулов, продуцирующими эстрадиол. **Ключевые слова:** ооциты, созревание *in vitro*, эстрадиол, партеногены, системы культивирования, *Bos taurus*.

Для цитирования: Кузьмина Т. И. Партеногенетическое развитие эмбрионов *Bos taurus* из ооцитов, созревших в различных системах культивирования // Аграрный вестник Урала. 2020. № 06 (197). С. 66–72. DOI: ...

Дата поступления статьи: 04.03.2020.

Постановка проблемы (Introduction)

Необходимость в разработке эффективных методов получения партеногенетических зародышей животных диктуется интенсификацией исследований в области фундаментальных основ формирования яйцеклетки, компетентной к созреванию *in vitro*, и совершенствованием инновационных клеточных репродуктивных технологий, в основе которых лежит базовый метод экстракорпорального созревания ооцитов (клонирование, трансгенез, в т. ч. редактирование генома с использованием технологии *CRISPR/Cas9*) [12], [14], [15]. Многочисленные исследования были инициированы для изучения влияния материнского и отцовского геномов на раннее развитие млекопитающих [6], [7], [9]. Для этих исследований партеногенетические эмбрионы явля-

ются уникальной моделью доимплантационного и раннего постимплантационного развития животных в отсутствие какого-либо вклада мужской гаметы. Партеногенетическая активация используется для биохимических и морфологических исследований ооцитов во время оплодотворения и раннего развития и является критическим компонентом процедуры клонирования [10]. Кроме того, анализ партеногенов является классическим способом исследования механизмов импринтинга [5], [11]. В последнее время разработка способов получения партеногенетических зародышей привлекает внимание для технологии конструирования партеногенетических линий эмбриональных стволовых клеток [5], [13]. Несмотря на то что партеногенетические зародыши получены у многих видов животных, протоко-

лы экспериментов требуют совершенствования. Для получения партеногенов млекопитающих используют модель экстракорпорального созревания донорских ооцитов с последующей их активацией. Существуют множество типов активации яйцеклеток, в том числе химическая, физическая, в итоге приводящие к подъему концентрации интрацитоплазматического кальция, как следствие, запускают процессы, приводящие к партеногенетическому развитию [3], [4], [8], [16]. Однако до сих пор оптимальной модели активации ооцитов коров к партеногенезу не разработано. Актуальной проблемой совершенствования технологии получения партеногенов продолжает оставаться система созревания женских гамет для получения как нативных, так и партеногенетических эмбрионов. Выявление факторов, детерминирующих приобретение донорскими ооцитами компетентности к партеногенетическому развитию, позволит смоделировать адекватную среду для повышения выхода партеногенов из активированных ооцитов для решения фундаментальных проблем регуляции активности генов в онтогенезе, получения гомозиготных линий эмбриональных стволовых клеток, совершенствования отдельных этапов технологии клонирования, моделирования состава сред для дозревания донорских ооцитов *in vitro*.

Цель настоящего исследования – с использованием различных систем экстракорпорального созревания ооцитов идентифицировать факторы, детерминирующие компетентность ооцитов *Bos taurus* к индуцированному холодным шоком партеногенезу.

Методология и методы исследования (Methods)

При проведении исследований использовали пост-мортальные яичники коров на стадии фолликулярного роста. Ооцит-кумулюсные комплексы аспирировали из антральных фолликулов диаметром от 3 до 8 мм с высоким тургором, широко разветвленной сетью капилляров и прозрачной оболочкой. Только ооциты с гомогенной цитоплазмой и не менее чем с 5–6 слоями кумулюсных клеток использовали для культивирования. Ооцит-кумулюсные комплексы культивировали в ТС-199, дополненной 10 % фетальной бычьей сыворотки (ФБС) и комплексом гормонов: 50 мкг/мл эстрадиола, 10 мкг/мл лютеинизирующего гормона, 10 мкг/мл фолликулостимулирующего гормона (система 1). Во второй экспериментальной группе для созревания использовали ТС-199 с 10 % эстральной сыворотки коров (система 2). Третья система культивирования состояла из ТС-199 с 50 % жидкости фолликулов диаметром 3–8 мм. В состав 4 системы входили ТС-199 и 50 % белков фолликулярной жидкости молекулярной массой 65 кДа. Для культивирования ооцит-кумулюсных комплексов 5 экспериментальной группы использовали ТС-199 с 10 % ФБС совместно с 1×10^6 клеток гранулезы на 1 мл среды. Стенки фолликулов диаметром 6–8 мм, ТС-199 с 10 % ФБС вошли в состав 6 системы культивирования. 7 система состояла из ТС-199 с 10 процентами ФБС, 1×10^6 клеток гранулезы на 1 мл среды и стенками фолликулов диаметром 6–8 мм.

Ооцит-кумулюсные комплексы культивировали в ТС-199 с 10 % фетальной бычьей сыворотки и гормонами: 50 мкг/мл эстрадиола, 10 мкг/мл лютеинизирующего гор-

мона, 10 мкг/мл фолликулостимулирующего гормона (система культивирования – 1). При проведении исследований использовали следующие системы культивирования: 1 – ТС-199 с добавлением 10 % фетальной бычьей сыворотки (ФБС); 2 – ТС-199 с добавлением 10 % эстральной сыворотки коров (ЭСК); 3 – ТС-199 с добавлением 50 % фолликулярной жидкости (ФЖ), выделенной из фолликулов диаметром 9 мм; 4 – среда ТС-199 с добавлением 50 % белков фолликулярной жидкости (БФЖ) с молекулярной массой 65 кДа; 5 – ТС-199 с добавлением 10 % ФБС совместно с 1×10^6 клеток гранулезы на 1 мл среды; 6 – ТС-199 с добавлением 10 % ФБС и оболочек фолликула (диаметр 6–8 мм); 7 – ТС-199 с добавлением 10% ФБС, 1×10^6 клеток гранулезы на мл среды и оболочки фолликула (диаметр 6–8 мм) [2, с.20]. Во все системы добавляли 50 мкг/мл гентамицина. Грубую фракцию белков получали из жидкости фолликулов (ЖФ) диаметром 2–8 мм осаждением сернокислым аммонием. Для этого ЖФ центрифугировали при 4 °С 30 минут со скоростью 5000 об/мин., затем к супернатанту добавляли кристаллический сернокислый аммоний $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ из расчета 320 г/л. Раствор перемешивали в течение 2 часов и центрифугировали 30 минут при 5000 об/мин. Осадок ресуспендировали в 33-процентном растворе $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Полученный осадок растворяли в трис-гидрохлоридном буфере 0,05 М рН 7,5 с 0,1 МНСL и диализировали против трех смен деионизированной воды, центрифугировали 30 минут при 5000 об/мин. Супернатант хранят при температуре – 30 °С. Хроматографическое разделение белков проводили гелифильтрацией в следующей последовательности. Полученный супернатант фолликулярной жидкости наносили на колонку размером 40×2 см с сефадексом g-100, уравновешенную 0,05 М трис-НСL буфером, рН с 0,1 МНСL 5,5 мг белка. Элюцию белков производили тем же буфером со скоростью 5 мл за 50 минут. Оптическую плотность элюируемых проб измеряли при 280 нм. Сравнительный анализ калиброванной колонки по стандартным белкам с известной молекулярной массой (бычий сывороточный альбумин – 65 000 Да, овальбумин – 40 000 Да, цитохром С – 12 000 Да) позволил заключить, что группа I типа представляет собой белки с молекулярной массой в пределах от 65 000 Да и более, II – от 35 000 до 65 000 Да, III – от 10 000 до 35 000 Да. Электрофорез белков проводили в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия (ДС-На) по методу Корнберга. Разделение белков производили в системе 18-процентного разделяющего и 4-процентного концентрирующего гелей в блоках размером 110×110×1 мм при силе тока 60–80 А и напряжении 80 В в течение 18–20 часов. Гомологичную фолликулярную жидкость предварительно инактивировали 5 минут при 100 °С. Для получения тканевой культуры фолликул разрывали пинцетами. Трехкратным промыванием ткань освобождали от фолликулярной жидкости, рассекали на фрагменты размером 600–900 мкм и размещали в чашке Петри в капли среды совместно с ооцит-кумулюсными комплексами. Гранулезные клетки получали путем аспирации жидкости из фолликулов диаметром 3–6 мм с обширной васкуляризацией и высоким тургором и последующим центрифугированием при 250 г 10 мин. После удаления супернатанта клет-

ки дважды отмывали путем ресуспендирования в среде ТС-199, содержащей 3 % ФБС (Sigma). Конечную концентрацию клеток подсчитывали в камере Горяева, долю живых клеток определяли с помощью трипанового синего (0,1-процентный раствор). Для культивирования использовали суспензию КГ в концентрации $(1,1-1,6) \cdot 10^6$ клеток в 1 мл среды, при этом доля живых клеток составляла не менее 60–80 %. Наличие деструктивных изменений в ядрах соматических клеток оценивали цитологическим анализом (окраска по Романовскому – Гимзе). Неперспективной для кокультивирования с ооцитами является популяция клеток гранулезы с более чем 20 % пикнотических клеток. Режимы культивирования ооцитов и доимплантационных эмбрионов *in vitro* представлены в наших публикациях ранее [1, с.10-11].

Индукцию ооцитов к партеногенетическому развитию проводили холодовым шоком (через 24 часа после начала культивирования. Ооциты помещали в капли среды (5 штук в капле 500 мкл) под маслом и активировали 20-минутной экспозицией при температуре 0–4 °С в криокамере. После холодового шока ооциты помещали в синтетическую среду яйцевода (SOF) с 5-процентной фетальной бычьей сывороткой. Отбор дробящихся зародышей проводили через 48 часов после активации,

Все использованные реагенты, за исключением обозначенных в тексте, производства компании Sigma-Aldrich, США. Пластиковая лабораторная посуда фирмы BD Falcon™.

Для сравнения результатов контрольных и опытных групп использовали критерии χ^2 (пакет статистической программы SigmaStat). Достоверность различия сравниваемых средних значений оценивали при трех уровнях значимости: $P < 0,05$; $P < 0,01$; $P < 0,001$. Эксперименты проводили в 4–5 повторностях.

Результаты (Results)

Проведенный нами ранее анализ показателей мейотического созревания ооцитов коров (достижение стадии метафазы-II), созревших в различных системах, дополненных в т. ч. и структурными компонентами фолликулов, а также потенциалов к развитию из них доимплантационных эмбрионов, выявил значительные различия по вышеуказанным параметрам [2, с.21]. Введение в среду дозревания стенок фолликула позволило получить оптимальный в серии экспериментов результат по доле эмбрионов на стадии бластоцисты. В целом дополнение систем культивирования структурными компонентами фолликула и его жидкости положительно сказывалось на развитии интактных эмбрионов. В связи с вышеизложенным оценка потенциалов к партеногенезу ооцитов коров, созревших в различных системах, позволит охарактеризовать роль структурных компонентов фолликула в возможности партеногенетического развития ооцитов при индуцированном партеногенезе. На рис. 1, 2 представлены данные, отражающие долю коров эмбрионов на различных стадиях доимплантационного развития, полученных из активированных к партеногенезу ооцитов, созревших в разных системах культивирования.



Рис. 1. Доля (%) партеногенетических зародышей *Bos taurus*, развившихся из ооцитов, созревших в различных системах культивирования (количество ооцитов – 940; количество зародышей – 554). Достоверность сравниваемых значений (χ^2 -test): ^{a,d}; ^{a,i}; ^{a,k}; ^{b,i} $P < 0,05$; ^{c,d}; ^{c,l} $P < 0,01$; ^{a,l}; ^{b,k}; ^{b,l}; ^{d,i}; ^{d,k}; ^{d,l} $P < 0,001$

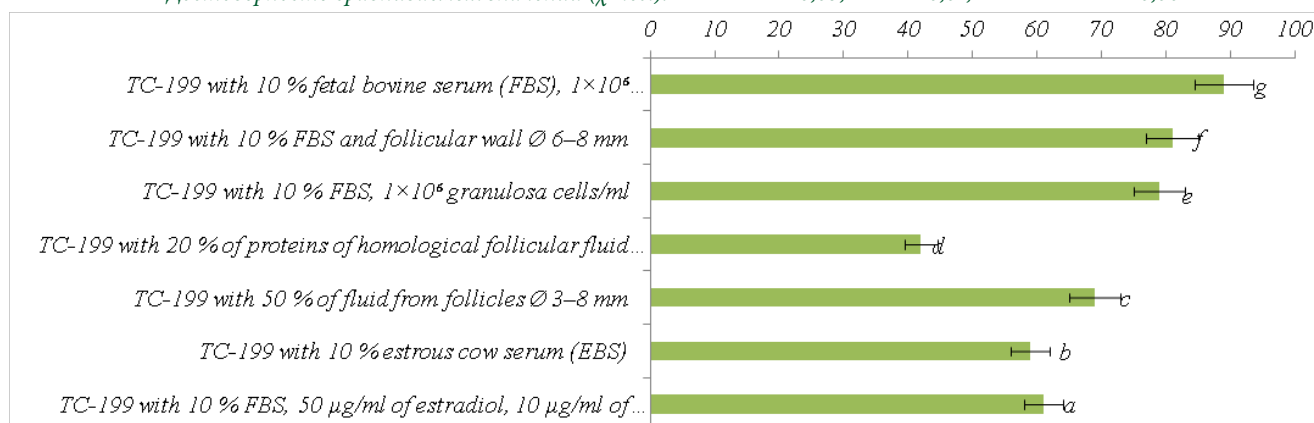


Fig. 1. The proportion (%) of parthenogenetic *Bos taurus* embryos developed from oocytes matured in various culture systems (number of oocytes – 940; number of embryos – 554). Reliability of the compared values (χ^2 -test): ^{a,d}; ^{a,i}; ^{a,k}; ^{b,i} $P < 0,05$; ^{c,d}; ^{c,l} $P < 0,01$; ^{a,l}; ^{b,k}; ^{b,l}; ^{d,i}; ^{d,k}; ^{d,l} $P < 0,001$

Максимальный уровень раздробившихся зигот (89 %) был получен в группе ооцитов, прокультивированных со стенками фолликулов, включающих клетки гранулезы, основной функцией которых является продукция эстрадиола, стероидного гормона, роль которого в приобретении ооцитами компетентности к созреванию постулирована. И, напротив, среда, лишенная как стероидов, так и структурных элементов фолликула, продуцирующих эстрадиол, детерминировала низкий выход дробящихся клеток (42 %). Наличие эстрадиола (как добавленного в виде реагента, так и продуцируемого введенными в состав системы созревания структурными компонентами фолликулов) способствовало росту доли полученных партеногенов (рис. 1).

При оценке проспективных потенций к развитию партеногенетических зародышей до завершающих стадий доимплантационного развития (поздняя морула, бластоциста) вышеуказанная тенденция не изменилась. Высокий уровень партеногенов на стадии бластоцисты был получен из ооцитов, созревших в системах с эстрадиолом или со структурными элементами фолликулов, продуцирующих эстрадиол (рис. 2). Оптимальные показатели по развитию доимплантационных эмбрионов коров были получены в группе, где ооциты культивировали в базовой среде ТС-199, дополненной стенками фолликулов и клетками гранулезы. В этой системе 45% зародышей достигли стадий поздней морулы и бластоцисты. Ооциты, созревшие в среде, лишенной эстрадиола или структурных компонентов фолликула, продуцирующих эстрадиол (система 4), имели низкие компетенции к индуцированному партеногенезу и отличались высокими показателями деструктивных изменений в полученных эмбрионах (рис. 3).

Результаты морфологической оценки партеногенетических эмбрионов выявили достоверные различия в доле дегенерированных эмбрионов (неравномерное дробление, наличие фрагментов цитоплазмы, вакуолизация, мультиядерность, отсутствие ядер в отдельных blastomeres, нарушение ploidy и др.), полученных из ооцитов, созревших в системах созревания с эстрадиолом и со структурными элементами фолликулов по сравнению с системами созревания, лишенными этих компонентов. Выход партеногенетических эмбрионов с признаками дегенерации из ооцитов, созревших в различных системах, составил 1 – 21 %; 2 – 28 %; 3 – 30 %; 4 – 52 %; 5 – 36 %; 6 – 35 %; 7 – 25 % (рис. 3) соответственно, что подтверждает позитивный эффект эстрадиола и продуцирующих его структурных компонентов фолликулов на развитие доимплантационных партеногенов *Bos taurus*.

Обсуждение и выводы (Discussion and Conclusion)

Проведенная работа направлена на модернизацию методов получения партеногенетических зародышей сельскохозяйственных животных (в частности коров).

В представленных материалах показана высокая эффективность использования холодного шока в качестве активатора партеногенетического развития доимплантационных эмбрионов *Bos taurus*. Введение в среду созревания ооцитов *Bos taurus* эстрадиола или структурных компонентов антральных фолликулов (оболочки фолликула, клетки гранулезы) способствовало увеличению доли партеногенов на доимплантационных стадиях развития (в том числе и бластоцисты) и снижению уровня дегенерированных партеногенетических эмбрионов.

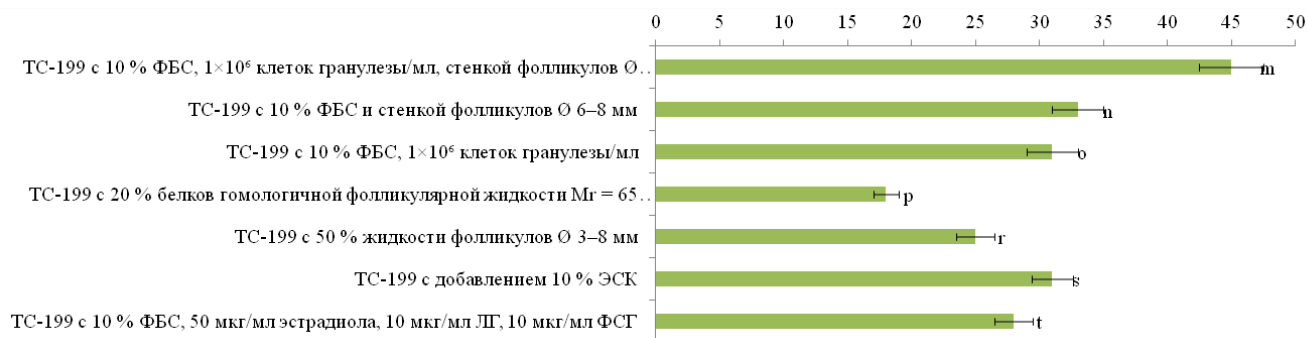


Рис. 2. Доля партеногенов (%) *Bos taurus* на завершающих стадиях доимплантационного развития (поздняя морула, бластоциста) (количество эмбрионов – 281).

Достоверность сравниваемых значений (χ^2 -test): $m;t; m;s; m;o; o;t$ $P < 0,05$; $m;r$ $P < 0,01$; $m;p; p;t$ $P < 0,001$

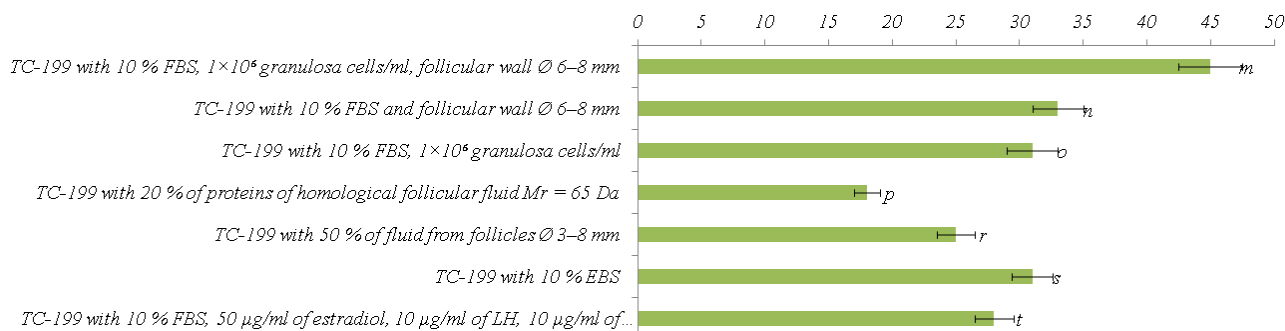


Fig. 2. The proportion (%) of *Bos taurus* parthenotes at the final stages of pre-implantation development (late morula, blastocyst) (number of embryos – 281). Reliability of the compared values (χ^2 -test): $m;t; m;s; m;o; o;t$ $P < 0.05$; $m;r$ $P < 0.01$; $m;p; p;t$ $P < 0.001$

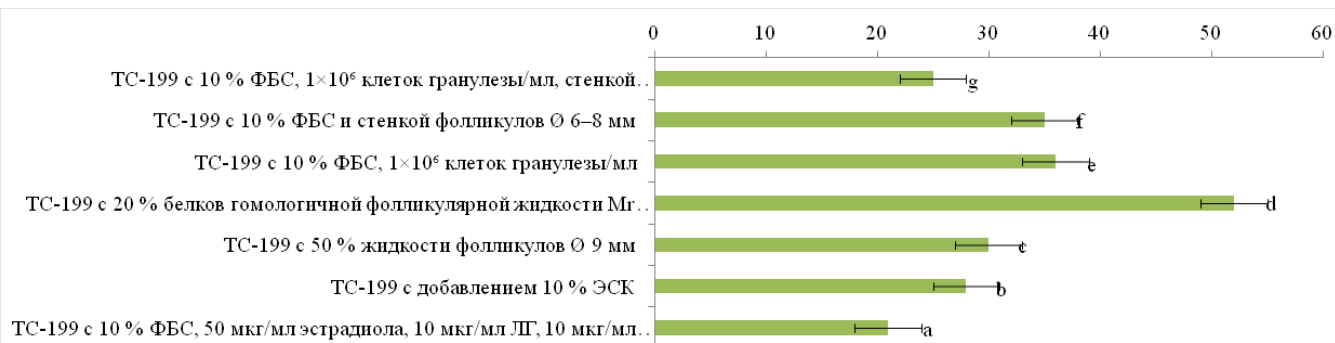


Рис. 3. Уровень (%) дегенерированных партеногенетических зародышей, полученных из ооцитов, созревших в различных системах культивирования (количество эмбрионов – 201). Достоверность сравниваемых значений (χ^2 -test): *b*; *b*; *c*; *d* $P < 0,05$; *b*; *g*; *d*; *e*; *d*; *f*; *d*; *g* $P < 0,001$; *c*; *e*; *f* $P < 0,05$

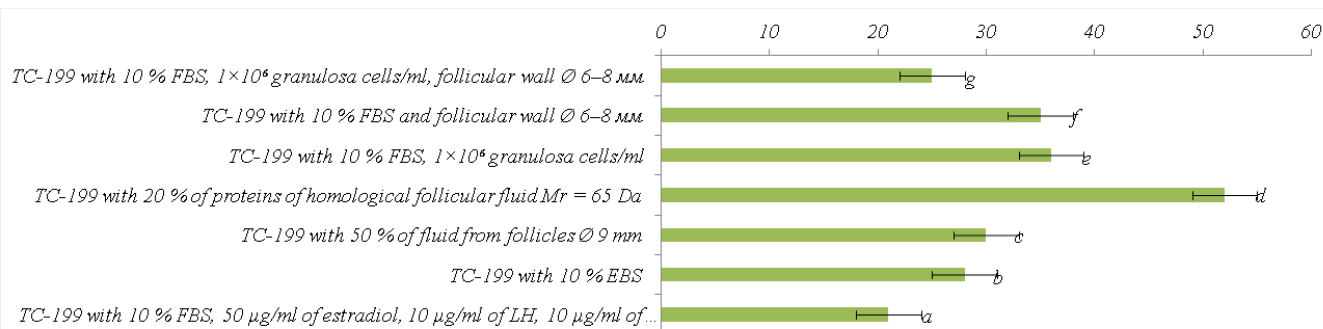


Fig. 3. The proportion (%) of degenerated parthenogenetic embryos obtained from oocytes matured in various culture systems (number of embryos – 201). Reliability of the compared values (χ^2 -test): *b*; *b*; *c*; *d* $P < 0.05$; *b*; *g*; *d*; *e*; *d*; *f*; *d*; *g* $P < 0.001$; *c*; *e*; *f* $P < 0.05$

Помимо идентификации эффектов структурных компонентов овариальных фолликулов и эстрадиола на потенции к развитию партеногенов, полученные данные способствуют лучшему пониманию механизмов функционирования ооцитов в условиях гипотермии для интенсификации исследований в области витрификации женских гамет.

В результате анализа полученных данных предложены нижеследующие рекомендации модернизации протокола экспериментов по получению партеногенетических эмбрионов коров: индукцию к партеногенезу проводить

холодовым шоком через 24 часа после начала культивирования ооцитов при экспозиция 20 минут, температуре 0...–4 °С, до момента активации к партеногенезу ооциты коров культивировать в средах, дополненных 50 нг/мл эстрадиола или структурными элементами антральных фолликулов, продуцирующими эстрадиол.

Благодарности (Acknowledgements)

Работа выполнена в соответствии с темой Минобрнауки Российской Федерации, номер госрегистрации – АААА-А18-118021590132-9.

Библиографический список

- Кузьмина Т. И., Молчанов А. В., Станиславович Т. И., Татарская Д. Н. Модернизация этапов технологии экстракорпорального созревания донорских ооцитов *Bos taurus* // Аграрный научный журнал. 2017. № 3. С. 9–14.
- Кузьмина Т. И., Чистякова И. В. Моделирование систем экстракорпорального созревания ооцитов *Bos taurus* с использованием структурных компонентов овариальных фолликулов // Молочное и мясное скотоводство. 2019. № 6. С. 20–22.
- Camargo L. S. A., Costa F. Q., Munk M., Wohlres-Viana S., Serapião R. V., Carvalho B. C., Campos P. H. Jr., Vieira A. C., Nogueira L. A. G., Viana J. H. M. Contrasting effects of heat shock during in vitro maturation on development of in vitro-fertilized and parthenogenetic bovine embryos // *Reproduction domestic animal*. 2019. Vol. 54. No. 10. Pp. 1357–1365.
- Català M. G., Roura M., Contreras I., Izquierdo D., Paramio T. In vitro embryo production of lamb oocytes after IVF, ICSI and parthenogenetic activation in autumn and winter // *Animal reproduction science*. 2016. Vol. 13. No. 3. P. 638.
- Kaneda M., Takahashi M., Yamanaka K. I., Saito K., Taniguchi M., Akagi S., Watanabe S., Nagai T. Epigenetic analysis of bovine parthenogenetic embryonic fibroblasts. // *Journal of Reproduction and Development*. 2017. Vol. 63. No. 4. Pp. 365–375. DOI: 10.1262/jrd.2017-040.
- Mendonça A. D. S., Silveira M. M., Rios A. F. L., Mangiavacchi P. M., Caetano A. R., Dode M. A. N., Franco M. M. DNA methylation and functional characterization of the XIST gene during in vitro early embryo development in cattle. // *Epigenetics*. 2019. Vol. 14. No. 6. Pp. 568–588. DOI: 10.1080/15592294.2019.1600828.
- Monzani P. S., Adona P. R., Ohashic O. M., Meirelles F. V., Wheeler M. B. Transgenic bovine as bioreactors: Challenges and perspectives // *Bioengineered*. 2016. Vol. 7. No. 3. Pp. 123–131. DOI: 10.1080/21655979.2016.1171429.

8. Que E. L., Duncan F. E., Lee H. C., Hornick J. E., Vogt S., Fissore R. A., O'Halloran T. V., Woodruff T. K. Bovine eggs release zinc in response to parthenogenetic and sperm-induced egg activation // *Theriogenology*. 2019. Vol. 127. Pp. 41–48. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2018.12.031.
9. Ross P. J., Sampaio R. V. Epigenetic remodeling in preimplantation embryos: cows are not big mice. // *Animal Reproduction*. 2018. Vol. 15. No. 3. Pp. 204–214.
10. Singh B., Mal G., Gautam S. K., Mukesh M. Parthenogenesis – A potential tool to reproductive biotechnology. // *Advances in Animal Biotechnology*. 2019. Springer. Pp. 239–248.
11. Smith L. C., Therrien J., Filion F., Bressan F., Meirelles F. V. Epigenetic consequences of artificial reproductive technologies to the bovine imprinted genes SNRPN, H19/IGF2, and IGF2R // *Frontiers in genetics*. 2015. Vol. 6 No. 58. Pp. 1–6. DOI: 10.3389/fgene/2015.00058.
12. Wu J., Vilarino M., Suzuki K., et al. CRISPR-Cas9 mediated one-step disabling of pancreatogenesis in pigs // *Scientific reports*. 2017. Vol. 7. P. 10487. DOI: 10.1038/s41598-017-08596-5.
13. Yamaguchi T., Ito M., Kuroda K., Takeda S., Tanaka A. The establishment of appropriate methods for egg-activation by human PLCZ1 RNA injection into human oocyte // *Cell Calcium*. 2017. Vol. 65. Pp. 22–30. DOI: 10.1016/j.ceca.2017.03.002.
14. Yum S. Y., Youn K. Y., Choi W. J., Jang G. Development of genome engineering technologies in cattle: from random to specific // *Journal of Animal Science and Biotechnology*. 2018. Vol. 9. No. 16. DOI: 10.1186/s40104-018-0232-6.
15. Zhong C., Xie Z., Yin Q., Dong R., Yang S., Wu Y., Yang L., Li J. Parthenogenetic haploid embryonic stem cells efficiently support mouse generation by oocyte injection // *Cell research*. 2016. Vol. 26. Pp. 131–134.
16. Zuo Z., Niu Z., Liu Z., Ma J., Qu P., Qiao F., Su J., Zhang Y., Wang Y. The effects of glycine-glutamine dipeptide replaced l-glutamine on bovine parthenogenetic and IVF embryo development // *Theriogenology*. 2020. Vol. 141. Pp. 82–90.

Об авторах:

Татьяна Ивановна Кузьмина¹, доктор биологических наук, профессор, заведующая лабораторией биологии развития, ORCID 0000-0002-4218-6080, AuthorID 78163, +7 921 392-19-47, prof.kouzmina@mail.ru

¹ Всероссийский научно-исследовательский институт генетики и разведения сельскохозяйственных животных – филиал федерального научного центра животноводства – ВИЖ имени академика Л. К. Эрнста, Пушкин, Россия

Partenogenetic development of *Bos taurus* embryos from oocytes matured in different culture systems

T. I. Kuzmina¹✉

¹ All-Russian Research Institute of Genetics and Breeding of Farm Animals – the branch of Federal Scientific Center for Animal Husbandry – All-Russian Research Institute of Livestock named after academician L. K. Ernst, Pushkin, Russia

✉E-mail: prof.kouzmina@mail.ru

Abstract. Identification of the factors determining of donor's oocyte competence to parthenogenetic development will allow developing an effective method for obtaining parthenotes to solve fundamental problems of regulating gene activity in ontogenesis, creating homozygous embryonic stem cell lines, improving the stages of cloning technology, and modeling of in vitro oocyte maturation media. **The purpose** of study is to evaluate the potencies of *Bos taurus* oocytes matured in different culture systems to cold shock-induced parthenogenesis. **Methods.** For oocyte maturation, culture systems of the following composition were used: 1 – TC-199 with 10 % fetal bovine serum (FBS), 50 µg/ml estradiol, 10 µg/ml luteinizing hormone, 10 µg/ml follicle-stimulating hormone; 2 – TC-199 with 10 % estrous serum of cows; 3 – TC-199 with 50 % fluid from follicles (Ø 3–8 mm); 4 – TC-199 with 50 % protein of follicular fluid (molecular weight of 65 kDa); 5 – TC-199 with 10 % FBS, 1×10⁶ granulosa cells/ml medium; 6 – TC-199 with 10 % FBS and walls of follicles (Ø 6–8 mm); 7 – TC-199 with 10 % FBS, 1×10⁶ granulosa cells/ml medium and walls of follicles (Ø 6–8 mm). After 24 hours of cultivation, the oocytes were activated by cold shock (exposure time 20 minutes, temperature 0...–4 °C). **Results.** The proportion of embryos at the stages of late morula and blastocysts from oocytes matured in system 7 was 45 % (58/129), which was significantly higher than in other systems: 1 – 28 % (39/141), $P < 0.05$; 2 – 31 % (42/137), $P < 0.05$; 3 – 25 % (33/133), $P < 0.01$; 4 – 18 % (25/139), $P < 0.001$; 5 – 31 % (41/132), $P < 0.05$; 6 – 33 % (43/129). The introduction of estradiol or structural components of antral follicles into the oocytes maturation medium contributed to an increase in the proportion of parthenotes at the preimplantation stages of development, including blastocysts, and a decrease in the level of degenerated embryos. **Scientific novelty.** A comparative morphological analysis of the potentials for parthenogenesis of bovine oocytes matured in various culture systems and activated by cold shock was carried out for the first time. Optimal systems for in vitro maturation of female gametes were proposed. Based on the analysis of the results, we recommend before induction to parthenogenesis bovine oocytes culture in media supplemented with 50 ng/ml estradiol or structural components of antral follicles producing estradiol.

Keywords: oocytes, in vitro maturation, estradiol, parthenotes, culture systems, *Bos taurus*.

For citation: Kuzmina T. I. Partenogeneticheskoe razvitiye embrionov *Bos taurus* iz ootsitov, sozrevshikh v razlichnykh sistemakh kul'tivirovaniya [Partenogenetic development of *Bos taurus* embryos from oocytes matured in different culture systems] // Agrarian Bulletin of the Urals. 2020. No. 06 (197). Pp. 66–72. DOI: ... (In Russian.)

Paper submitted: 04.03.2020.

References

1. Kuz'mina T. I., Molchanov A. V., Stanislavovich T. I., Tatarskaya D. N. Modernizatsiya etapov tekhnologii ekstrakorporal'nogo sozrevaniya donorskikh ootsitov *Bos taurus* [Modeling of extracorporeal maturation systems of *Bos taurus* oocytes using structural components of ovarian follicles] // The Agrarian Scientific Journal. 2017. No. 3. Pp. 9–14. (In Russian.)
2. Kuz'mina T. I., Chistyakova I. V. Modelirovaniye sistem ekstrakorporal'nogo sozrevaniya ootsitov *Bos taurus* s ispol'zovaniem strukturnykh komponentov ovarial'nykh follikulov [Modernization of the stages of in vitro donor oocytes maturation technology in *Bos taurus*] // Dairy and Beef Cattle Farming. 2019. No. 6. Pp. 20–22. (In Russian.)
3. Camargo L. S. A., Costa F. Q., Munk M., Wohlfres-Viana S., Serapião R. V., Carvalho B. C., Campos P. H. Jr., Vieira A. C., Nogueira L. A. G., Viana J. H. M. Contrasting effects of heat shock during in vitro maturation on development of in vitro-fertilized and parthenogenetic bovine embryos // Reproduction domestic animal. 2019. Vol. 54. No. 10. Pp. 1357–1365.
4. Català M. G., Roura M., Contreras I., Izquierdo D., Paramio T. In vitro embryo production of lamb oocytes after IVF, ICSI and parthenogenetic activation in autumn and winter // Animal reproduction science. 2016. Vol. 13. No. 3. P. 638.
5. Kaneda M., Takahashi M., Yamanaka K. I., Saito K., Taniguchi M., Akagi S., Watanabe S., Nagai T. Epigenetic analysis of bovine parthenogenetic embryonic fibroblasts. // Journal of Reproduction and Development. 2017. Vol. 63. No. 4. Pp. 365–375. DOI: 10.1262/jrd.2017-040.
6. Mendonça A. D. S., Silveira M. M., Rios A. F. L., Mangiavacchi P. M., Caetano A. R., Dode M. A. N., Franco M. M. DNA methylation and functional characterization of the XIST gene during in vitro early embryo development in cattle. // Epigenetics. 2019. Vol. 14. No. 6. Pp. 568–588. DOI: 10.1080/15592294.2019.1600828.
7. Monzani P. S., Adona P. R., Ohashic O. M., Meirelles F. V., Wheeler M. B. Transgenic bovine as bioreactors: Challenges and perspectives // Bioengineered. 2016. Vol. 7. No. 3. Pp. 123–131. DOI: 10.1080/21655979.2016.1171429.
8. Que E. L., Duncan F. E., Lee H. C., Hornick J. E., Vogt S., Fissore R. A., O'Halloran T. V., Woodruff T. K. Bovine eggs release zinc in response to parthenogenetic and sperm-induced egg activation // Theriogenology. 2019. Vol. 127. Pp. 41–48. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2018.12.031.
9. Ross P. J., Sampaio R. V. Epigenetic remodeling in preimplantation embryos: cows are not big mice. // Animal Reproduction. 2018. Vol. 15. No. 3. Pp. 204–214.
10. Singh B., Mal G., Gautam S. K., Mukesh M. Parthenogenesis – A potential tool to reproductive biotechnology. // Advances in Animal Biotechnology. 2019. Springer. Pp. 239–248.
11. Smith L. C., Therrien J., Filion F., Bressan F., Meirelles F. V. Epigenetic consequences of artificial reproductive technologies to the bovine imprinted genes SNRPN, H19/IGF2, and IGF2R // Frontiers in genetics. 2015. Vol. 6 No. 58. Pp. 1–6. DOI: 10.3389/fgene.2015.00058.
12. Wu J., Vilarino M., Suzuki K., et al. CRISPR-Cas9 mediated one-step disabling of pancreatogenesis in pigs // Scientific reports. 2017. Vol. 7. P. 10487. DOI: 10.1038/s41598-017-08596-5.
13. Yamaguchi T., Ito M., Kuroda K., Takeda S., Tanaka A. The establishment of appropriate methods for egg-activation by human PLCZ1 RNA injection into human oocyte // Cell Calcium. 2017. Vol. 65. Pp. 22–30. DOI: 10.1016/j.ceca.2017.03.002.
14. Yum S. Y., Youn K. Y., Choi W. J., Jang G. Development of genome engineering technologies in cattle: from random to specific // Journal of Animal Science and Biotechnology. 2018. Vol. 9. No. 16. DOI: 10.1186/s40104-018-0232-6.
15. Zhong C., Xie Z., Yin Q., Dong R., Yang S., Wu Y., Yang L., Li J. Parthenogenetic haploid embryonic stem cells efficiently support mouse generation by oocyte injection // Cell research. 2016. Vol. 26. Pp. 131–134.
16. Zuo Z., Niu Z., Liu Z., Ma J., Qu P., Qiao F., Su J., Zhang Y., Wang Y. The effects of glycine-glutamine dipeptide replaced l-glutamine on bovine parthenogenetic and IVF embryo development // Theriogenology. 2020. Vol. 141. Pp. 82–90.

Authors' information:

Tatiana I. Kuzmina¹, doctor of biological sciences, professor, head of the laboratory of developmental biology, ORCID 0000-0002-4218-6080, AuthorID 78163, +7 921 392-19-47, prof.kouzmina@mail.ru

¹All-Russian Research Institute of Genetics and Breeding of Farm Animals – the branch of Federal Scientific Center for Animal Husbandry – All-Russian Research Institute of Livestock named after academician L. K. Ernst, Pushkin, Russia