



ПАРТЕНОГЕНЕТИЧНА АКТИВИЗАЦИЯ НА ЯЙЦЕКЛЕТКИТЕ *IN VITRO* КАТО ЕДИН ОТ БИОТЕХНОЛОГИЧНИТЕ МЕТОДИ ЗА СЪХРАНЯВАНЕ НА ГЕНЕТИЧНИЯ ПОТЕНЦИАЛ НА СЕЛСКОСТОПАНСКИТЕ ЖИВОТНИ

(Обзор)

ПАРТЕНОГЕНЕТИЧЕСКАЯ АКТИВАЦИЯ ЯЙЦЕКЛЕТОК *IN VITRO* КАК ОДИН ИЗ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ МЕТОДОВ СОХРАНЕНИЯ ГЕНЕТИЧЕСКОГО ПОТЕНЦИАЛА СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ ЖИВОТНЫХ

(Обзор)

PARTHENOGENETIC ACTIVATION OF OOCYTES OF *IN VITRO* AS ONE OF BIOTECHNOLOGICAL METHODS OF PRESERVATION OF A GENETIC POTENTIAL OF AGRICULTURAL ANIMALS

(Review)

**Лариса Остаповец
Larisa Ostapovets**

Институт по развъждане и генетика на животните, Национална академия на аграрните науки на Украйна
с. Чубинское, Киевска област, 08321

Институт разведения и генетики животных, Национальная академия аграрных наук Украины
с. Чубинское, Киевская область, 08321

Institute of Animal Breeding and Genetic of the National Academy of Agrarian Sciences
v. Chubynske, Kyiv Region, 08321

E-mail: ostlara@online.ua

Резюме

В статията са обобщени резултатите от изследванията на автора и литературни източници относно активацията на *in vitro* узрели ооцити за партеногенетично развитие при селскостопанските животни. Изложени са основните принципи и методологични постановки на експериментите по партеногенетична активация на яйцеклетките извън организма. Обсъждат се биологичните основи, проблемите и перспективите за използване на *in vitro* партеногенетичната активация на яйцеклетките при селскостопанските животни.

Резюме

Обобщены данные литературы и результаты исследований автора об активации созревших *in vitro* ооцитов сельскохозяйственных животных к партеногенетическому развитию. Изложены основные принципы и положения методологии экспериментов по партеногенетической активации яйцеклеток сельскохозяйственных животных вне организма. Обсуждаются биологические основы, проблемы и перспективы применения партеногенетической активации яйцеклеток сельскохозяйственных животных *in vitro*.

Abstract

The data of literature and results of own investigations of the author on activation of maturation *in vitro* oocytes of agricultural animals to parthenogenetic development are summarized. The main laws and states of investigations methodology on the parthenogenetic activating of oocytes of agricultural animals out of organism were presented. The author discussed the biological bases, problems and prospects of application of the parthenogenetic activation of oocytes of agricultural animals *of in vitro*.

Ключови думи: яйцеклетка, партеногенетична активация, *in vitro*, ембрион.

Ключевые слова: яйцеклетка, партеногенетическая активация, *in vitro*, эмбрион.

Key words: oocyte, parthenogenetic activation, *in vitro*, embryo.

На современном этапе развития животноводства особое значение при воспроизводстве и селекции сельскохозяйственных животных имеет репродуктивная

биотехнология. Более широкое применение в практике животноводства новых биотехнологических приемов и методов размножения даст возможность повысить

эффективность использования современных генетико-селекционных методов и интенсифицировать селекционную работу по совершенствованию племенных и продуктивных качеств животных. Особенно актуальными становятся направления биотехнологии воспроизводства по разработке нетрадиционных методов размножения, сохранения сельскохозяйственных животных с ценными генотипами и создания новых уникальных по генетическому потенциалу животных. К таким направлениям можно отнести получение *in vitro* IVF- и партеногенетических эмбрионов, клонирование методом пересадки ядер, интрацитоплазматическое оплодотворение, трансплантация эмбрионов, что вместе с трансгенными технологиями открывает большие перспективы их использования в животноводстве (Nagashima, 2003; Ernst, 2006; Kobayashi, 2007; Deshmukh, 2011).

В последние годы значительно вырос научный интерес к исследованиям направленным на получение партеногенетических эмбрионов сельскохозяйственных животных *in vitro*. Партеногенез – способность женских половых клеток развиваться без участия сперматозоидов. Впервые возможность искусственного партеногенеза была показана Тихомировым в 1886 г. на примере тутового шелкопряда, где после обработки яиц разными химическими и физическими факторами, их партеногенетическое развитие останавливалось на стадии вылупления личинки. В 40-х годах XX ст. Астауров подтвердил возможность получения партеногенетического потомства после применения термической активации яиц тутового шелкопряда. Первые попытки получения партеногенетических эмбрионов млекопитающих предприняты Пинкусом в 30-х годах XX ст., но только в начале 80-х годов исследования приобрели более широкое развитие (Diban i Hozhay, 1980; Golubev i dr., 1985). В эти годы исследования по изучению закономерностей раннего эмбрионального развития при использовании партеногенетической активации гамет проводились в основном на яйцеклетках мышей (O'Neill, 1989; Onodera, 1989). С того времени метод искусственной активации яйцеклеток нашел свое применение не только для получения *in vitro* партеногенетических эмбрионов млекопитающих. Определение оптимальных условий активации яйцеклеток имеет так же важное значение для успешного проведения таких эмбриотехнологий, как интрацитоплазматическая инъекция сперматозоида, клонирование животных методом пересадки ядер (Morozova i dr., 2004; Kobayashi, 2007; Keefer, 2008).

При получении партеногенетических эмбрионов *in vitro* одним из важных моментов является поиск оптимизации режима искусственной активации яйцеклеток. Оптимальное время для проведения партеногенетической активации может зависеть, с одной

стороны, от времени, необходимого для завершения полноценного ядерного и цитоплазматического созревания, и с другой стороны от времени, когда в зрелом ооците начинаются процессы дегенерации, при этом оба показателя могут быть видоспецифичными. Установлено, что для ооцитов свиней необходим более длительный период созревания *in vitro*, по сравнению с коровами (Lechniak, 1996), лошадьми (Sosnowski, 1997). Период созревания *in vitro* ооцитов свиней, по данным разных авторов, составляет от 36 до 48 часов (Wang, 1997; Motlik, 1998; Prather, 1998). Нами показано, что после партеногенетической активации ооцитов свиней *in vitro*, которые созревали 44 часа, наблюдалось увеличение формирования партеногенетических эмбрионов, по сравнению с 46 и 48 часами культивирования (Ostapovets, 2006). Противовес позитивному влиянию увеличения продолжительности созревания ооцитов коров от 24 до 40 часов на уровень активации яйцеклеток и формирования партеногенетических эмбрионов (Liu, 1998; Kikuchi, 1995). Это подтверждается исследованиями, где после партеногенетической активации ооцитов коров через 30 часов созревания *in vitro* уровень активации яйцеклеток и дальнейшего их дробления был существенно выше, по сравнению с 24 часами созревания *in vitro* (Kuznetsova i Kuznetsov, 2000).

В зависимости от того, на какой стадии мейоза (метафаза I или метафаза II) будет происходить партеногенетическая активация ооцитов, вида активатора и других факторов, последующее развитие активированных гамет может приводить к получению разных типов партеногенетических эмбрионов (генетически однородные, неоднородные и мозаичные гаплоиды, гетерозиготные диплоиды, амейотические гетерозиготные диплоиды) (Ernst i Sergeev, 1989). В последнее время особенной актуальности приобрели исследования по изучению возможности партеногенетической активации *in vitro* ооцитов на ранних стадиях мейоза, например, метафаза I. Это может способствовать получению новых типов диплоидных партеногенетических эмбрионов и «приблизить решение вопроса об амейотическом партеногенезе млекопитающих» (Diban, 1988). Так, Golubev i dr. (1985) было показано, что активация ооцитов коров на стадии метафазы I мейоза *in vitro* холодным шоком приводит к формированию 2–4-клеточных партеногенетических эмбрионов. После активации ооцитов свиней на метафаза I комбинацией этанола с циклогексамидом получены 2–6-клеточные партеногенетические эмбрионы *in vitro* (Shtegelyskaya, 1996). Однако, Д. Кубяк с соавторами (1991) предложил другой способ получения амейотических партеногенетических эмбрионов *in vitro*. Суть способа состояла в ингибировании первого редукционного деления мейоза у ооцитов мышей гетерозиготных по локусу



глюкозофосфат-изомеразы (GPI) с использованием цитохалазина D и последующей активацией таких гамет к амейотическому партеногенезу. Применение цитохалазина D обусловлено его способностью блокировать полимеризацию актиновых микрофиламентов, что приводит к ингибированию экстрюзии первого полярного тельца во время прохождения редукционного деления мейоза. Таким образом, останавливается процесс цитокинеза, в тоже время не препятствуется прохождению кариокинеза, в результате чего происходит формирование тетра-плоидных ооцитов, которые после активации, завершения 2-го мейотического деления и выделения полярного тельца имеют диплоидный набор хромосом. Гетерозиготность этих партеногенонов была подтверждена электрофоретическим анализом изоформ GPI, где все проанализированные эмбрионы содержали три изоформы фермента, характерных для гетерозигот. Такие партеногенетические эмбрионы развивались до стадии бластоцисты, но после трансплантации реципиентам их развитие остановилось на 9-10 день (Kubiak, 1991). Этот подход дал возможность получить партеногенетические эмбрионы коров (Kuznetsova i Kuznetsov, 2000) и свиней (Ostapovets, 2010), которые развивались до стадии ранней морулы.

Как было отмечено, в последние годы значительно вырос интерес к исследованиям направленным на активацию яйцеклеток млекопитающих к партеногенетическому развитию *in vitro*. Получение партеногенетических эмбрионов *in vitro* дает возможность более полноценно подойти к решению проблем генетики развития, которые связаны с вопросами раннего эмбриогенеза млекопитающих: раскрытию механизмов инициации эмбриогенеза, эпигенетического контроля функционирования генома, анализа роли определенных генов в процессе эмбрионального развития, моделирование и корректирование наследственных заболеваний человека. В связи с недостаточно изученным механизмом геномного импринтинга остается открытым вопрос получения у млекопитающих жизнеспособного потомства путем партеногенеза. Поэтому использование партеногенетических эмбрионов для получения химерных животных может быть экспериментальной моделью для исследования механизмов инициации эмбрионального развития, анализа функции генов, а именно определения отличий в функционировании мужского и женского геномов на протяжении раннего эмбриогенеза, половой детерминации, получения трансгенных животных (Surani, 1991; Boediono, 1999; Lunney, 2007; Singh, 2012). Использование партеногенетических эмбрионов, как источника эмбриональных стволовых клеток, является предпосылкой для решения проблем, связанных с получением эмбриональных стволовых клеток, как в

методическом, так и морально-этическом аспекте (Cibelli, 2002; Koh, 2009; Ruggeri, 2012). Кроме того, не смотря на достигнутые успехи в получении биологически полноценных эмбрионов свиней, после оплодотворения яйцеклеток *in vitro*, эффективность данного метода находится на более низком уровне по сравнению с получением таких эмбрионов у других видов сельскохозяйственных животных. Так, одной из проблем при получении эмбрионов свиней *in vitro* является высокий уровень полиспермного оплодотворения яйцеклеток *in vitro*, который значительно влияет на эффективность формирования эмбрионов на доимплантационных стадиях развития (Abeydeera, 2002). Применение партеногенетической активации яйцеклеток свиней *in vitro* даст возможность исключить негативное влияние полиспермного оплодотворения, что позволит разработать оптимальные критерии отбора биологически полноценных незрелых ооцитов, оптимизировать системы созревания ооцитов и культивирования эмбрионов *in vitro*.

Таким образом, не вызывает сомнения значимость и перспективность применения метода партеногенетической активации яйцеклеток *in vitro* для решения фундаментальных проблем генетики и биологии развития сельскохозяйственных животных.

LITERATURA

- Golubev, A. K., I. V. Kudryavtsev, V. E. Kuznetsov, L. D. Galieva, 1985. Tsitogeneticheskiy analiz ootsitov korov pri ih stimulyatsii k partenogenezu. – V: Materiali I Vsesoyuznoy konferentsii po tsitogenetike selyskohozyaystvennih zhivotnih. (10-13 noyabrya 1985, Moskva). s. 13-14.
- Diban, A. P., 1988. Rannee razvitie mlekopitayushtih. Leningrad, Nauka, s. 119.
- Diban, A. P., L. I. Hozhay, 1980. Partenogeneticheskoe razvitie ovulirovavshih mishinih yaytsekletok pod vliyaniem etilovogo spirta. – Byulleteny eksperimentalnoy biologii i meditsini, 139: 487-489.
- Ostapovets, L. I., 2006. Primenenie metoda iskusstvennoy aktivatsii v reproduktivnoy biotehnologiya. – V: Materiali mezhdunarodnoy nauchnoy konferentsii «Sovremennye dostizhenia i problemi biotehnologii selyskohozyaystvennih zhivotnih» (19-20 dekabrya 2006, Dubrovitsi, Rossia), s.149-150.
- Ostapovets, L. I., 2010. Tsitogenetichna harakteristika ootsitiv sviney pri otrimanni partenogenetichnih embrioniv pislya ingibuvannya reduktsiyogo dilennya meyozu in vitro. – Naukoviy visnik Lyvivskogo natsionalnogo universitetu veterinarnoi meditsini ta biotehnologii im. S.Z. Gzhitsykogo, 12 (№ 2(44)): 225-229.
- Kuznetsova, I. B., V. E. Kuznetsov, O. O. Lukashenko, 2000. Aktivatsiya ootsitiv koriv do partenogenetichnogo rozvitku etanolom. – Tsitologia i genetika, 34 (1): 57-64.

- Morozova, L. M., I. N. Vagina, A. P. Solomko, 2004. Sovremennoe sostoyanie i problemi klonirovaniya mlekoopitayushchih. – Biopolimeri i klitina, 1–2: 116-120.
- Shtegelyskaya, E. A., 1996. Rannee partenogeneticheskoe razvitiye posle aktivatsii ootsitov sviny na metafaze I. – B: Materiali mezhdunarodnoy nauchno-prakticheskoy konferentsii «Teoria i praktika plemennogo dela v zhivotnovodstve». Harykov, 74-75.
- Ernst, L. K., N. I. Sergeev, 1989. Transplantatsiya embrionov selyskohozyaystvennih zhivotnih. M., VO Agroprom-izdat, 23-32.
- Ernst, L. K., 2006. Fundamentalnyie i prikladnie problemi selyskohozyaystvennoy biotekhnologiya. – Vestnik RASHN, 1: 9-11.
- Abeydeera, L. R., 2002. *In vitro* production of embryos in swine. – Theriogenology, 57 (1): 257-273.
- Boediono, A., T. Suzuki, L. Y. Li, R. A. Godke, 1999. Offspring born from chimeras reconstructed from parthenogenetic and *in vitro* fertilized bovine embryos. – Mol. Reprod. Dev., 53: 159-170.
- Cibelli, J. B., K. A. Grant, K. B. Chapman, K. Cunniff, T. Worst, H. L. Green, S. J. Walker, P. H. Gutin, L. Vilner, V. Tabar, T. Dominko, J. Kane, P. J. Wettstein, R. P. Lanza, L. Studer, K. E. Vrana, M. D. West, 2002. Parthenogenetic stem cells in nonhuman primates. – Science, 295: 819.
- Deshmukh, R. S., O. Østrup, E. Østrup, M. Vejlsted, H. Niemann, A. Lucas-Hahn, B. Petersen, J. Li, H. Callesen, P. Hyttel, 2011. DNA methylation in porcine preimplantation embryos developed *in vivo* and produced by *in vitro* fertilization, parthenogenetic activation and somatic cell nuclear transfer. – Epigenetics, 6 (2): 177-187.
- Keefer, C. L., 2008. Lessons learned from nuclear transfer (cloning). – Theriogenology, 69 (1): 48-54.
- Kikuchi, K., Y. Izaike, J. Noguchi, T. Furukawa, F. P. Daen, K. Naito, Y. Toyoda, 1995. Decrease of histone H1 kinase activity in relation to parthenogenetic activation of pig follicular oocytes matured and aged *in vitro*. – Journal of reproduction and fertility, 105 (2): 325-330.
- Kobayashi, M., S. Asakuma, Y. Fukui, Kobayashi, 2007. Blastocyst production by *in vitro* maturation and development of porcine oocytes in defined media following intracytoplasmic sperm injection. – Zygote, 15 (2): 93-102.
- Koh, C. J., D. M. Delo, J. W. Lee, M. M. Siddiqui, R. P. Lanza, S. Soker, J. J. Yoo, A. Atala, 2009. Parthenogenesis-derived multipotent stem cells adapted for tissue engineering applications. – Methods, 47 (2): 90-97.
- Kubiak, J., A. Paldi, M. Weber, B. Maroet, 1991. Genetically identical parthenogenetic mouse embryos produced by inhibition of first meiotic cleavage with cytochalasin D. – Development, 111 (3): 763-769.
- Lechniak, D., 1996. The incidence of polyploidy and mixoploidy in early bovine embryos derived from *in vitro* fertilization. – Genetics selection evolution, 28 (4): 321-328.
- Liu, L., J. C. Ju, X. Yang, 1998. Parthenogenetic development and protein patterns of newly matured bovine oocytes after chemical activation. – Molecular reproduction and development, 49 (3): 298-307.
- Lunney, J. K., 2007. Advances in Swine Biomedical Model. – Genomics, Int. J. Biol. Sci., 3 (3): 179-184.
- Motlik, J., N. Crozet, J. Fulka, 1984. Meiotic competence *in vitro* of pig oocytes isolated from early antral follicles. – Journal of reproduction and fertility, 72 (2): 323-328.
- Nagashima, H., T. Fujimura, Y. Takahagi, M. Kurome, N. Wako, T. Ochiai, R. Esaki, K. Kano, S. Saito, M. Okabe, H. Murakami, 2003. Development of efficient strategies for the production of genetically modified pigs. – Theriogenology, 59 (1): 95-106.
- O'Neill, G. T., M. H. Kaufman, 1989. Cytogenetic analysis of ethanol-induced parthenogenesis. – Journal of experimental zoology, 249 (2): 182-192.
- Onodera, M., Y. Tsunoda, 1989. Parthenogenetic activation of mouse and rabbit eggs by electric stimulation *in vitro*. – Gamete Research, 22 (3): 277-283.
- Prather, R. S., B. N. Day, 1998. Practical considerations for the *in vitro* production of pig embryos. – Theriogenology, 49 (1): 23-32.
- Ruggeri, R. R., Y. Watanabe, F. Meirelles, F. F. Bressan, N. Frant, A. Bos-Mikich, 2012. The use of parthenogenetic and IVF bovine blastocysts as a model for the creation of human embryonic stem cells under defined conditions. – J. Assist. Reprod. Genet., 29 (10): 1039-1043.
- Singh, K. P., R. Kaushik, V. Garg, R. Sharma, A. George, M. K. Singh, R. S. Manik, P. Palta, S. K. Singla, M. S. Chauhan, 2012. Expression pattern of pluripotent markers in different embryonic developmental stages of buffalo (*Bubalus bubalis*) embryos and putative embryonic stem cells generated by parthenogenetic activation. – Cell Reprogram, 14 (6): 530-538.
- Sosnowski, J., D. Lechniak, M. Brzozowska, M. Switonski, 1997. Cytogenetic analysis of horse oocytes matured *in vitro* for different periods of time. – Reproduction nutrition development, 37 (1): 63-68.
- Surani, M. A., 1991. Influence of genome imprinting on gene expression, phenotypic variations and development. – Hum. Reprod., 6 (1): 45-51.
- Wang, W. H., M. Hosoe, Y. Shioya, 1997. Induction of cortical granule exocytosis of pig oocytes by spermatozoa during meiotic maturation. – Journal of reproduction and fertility, 109 (2): 247-255.

Статията е приета на 12.12.2012 г.

Рецензент – проф. Димитрина Качева–Околийска, д-р

E-mail: dikacheva@hotmail.com