

Т. И. Кузьмина, Х. Альм

Компетентность к индуцированному партеногенезу ооцитов *Bos Taurus* в зависимости от функционального статуса гаметы и ее происхождения (диаметра фолликула)

Аннотация. Разработка эффективных методов получения партеногенетических зародышей в настоящее время рассматривается в новом ракурсе, как перспективная технология для создания гомозиготных линий эмбриональных стволовых клеток, генетически идентичных особей млекопитающих, а партеногенетические зародыши животных разных видов используют в качестве модели для изучения механизмов импринтинга. В настоящем исследовании партеногенетические зародыши *Bos Taurus* получали индукцией холодовым шоком (экспозиция 20 минут при температуре — 0–(–4) °C) ооцитов после культивирования в среде ТС-119 с 10% фетальной бычьей сыворотки, 50 нг/мл пролактина, 50 мкг/мл гентамицина совместно с 1×10^6 клеток гранулезы на мл среды в течение 24 часов. Предварительно исходная популяция донорских ооцитов из яичников животных подвергалась ВСВ-тесту с целью оценки функционального статуса. Для этого ооцит-кумулюсные комплексы помещали в раствор бриллиантового кристаллического голубого — ВСВ (В-5388, Sigma) в концентрации 13 Мм на 60 минут при температуре 38,5 °C в атмосфере 90% влажности. По истечении времени воздействия ВСВ ооциты ранжировали на: ооциты с голубой окраской цитоплазмы — ВСВ⁺ (ооциты, завершившие фазу роста) и неокрашенные ооциты (без голубой окраски цитоплазмы) — ВСВ[–] (растущие ооциты). Обнаружено, что функциональный статус (растущие или завершившие фазу роста) ооцитов и их происхождение (диаметр фолликулов из которых выделяли гаметы) детерминируют их потенции к индуцированному партеногенезу. Завершившие фазу роста ооциты *Bos Taurus* обладают высокими потенциями к индуцированному холодовым шоком партеногенезу, что выражается в значительном росте доли развившихся из них эмбрионов на всех стадиях доимплантационного развития (процент дробления — 87% против 11%, $P < 0,001$; выход поздних морул бластоцист — 32% против 6%, $P < 0,001$). Мониторинг показателей компетентности к партеногенезу ооцитов *Bos Taurus*, выделенных из фолликулов разного диаметра (<3 мм, 3–5 мм, >5–8 мм), выявил низкие потенции к индуцированному холодовым шоком партеногенезу ооцитов, выделенных из фолликулов менее 3 мм в диаметре (процент дробления 20% против 67% и 87%, $P < 0,001$, соответственно; выход поздних морул бластоцист — 9% против 22% и 37%, $P < 0,001$, соответственно).

Ключевые слова: партеногенез, ооциты, созревание in vitro, ВСВ-тест, *Bos Taurus*.

Авторы:

Кузьмина Татьяна Ивановна — доктор биологических наук, ВНИИГРЖ — филиал ФГБНУ «ФНЦ животноводства — ВИЖ имени академика Л. К. Эрнста»; 196601, Россия, г. Санкт-Петербург, п. Тярлево, Московское шоссе, 55а; e-mail: prof.kouzmina@mail.ru;

Альм Ханна — кандидат биологических наук, Лейбницкий Институт биологии сельскохозяйственных животных, Wilhelm-Stahl-Allee 2, 18196, Думмерсторф, Германия; e-mail: ca.alm@t-online.de.

Введение. Впечатляющие эксперименты по клонированию и редактированию генома млекопитающих вызвали интерес исследователей к разработке сопутствующих клеточных репродуктивных технологий [1]. Одним из методов создания генетически идентичных особей является их партеногенетическое развитие. У млекопитающих описан как спонтанный, так и индуцированный парте-

ногенез [2]. Известны многочисленные активаторы партеногенетического развития у животных, в том числе этанол, ионофор А23187, иономицин, электрические импульсы, эффект которых выражается в резком подъеме цитозольного кальция, что влечет стимуляцию ооцитов к партеногенезу [3, 4, 5]. Тем не менее, эти протоколы активации недостаточно эффективны. Показано, что в неко-

торых случаях партеногены мышей завершают доимплантационное развитие. Иногда такие зародыши имплантируются и развиваются непродолжительное время после имплантации. Известны случаи рождения живого потомства у мышей из партеногенетического эмбриона [6], а также при использовании эмбриональных стволовых клеток, полученных из партеногенетических зародышей [5, 7]. Потенциал развития активировавшихся яйцеклеток зависит от способа активации ооцитов млекопитающих: тепловым или холодным шоком, электрическим током, химическими реагентами [2, 8]. В настоящее время партеногенетические зародыши сельскохозяйственных животных на стадии бластоцисты получены у свиней, коров и лошадей [8, 9, 10, 11, 12]. Все эти технологии основаны на использовании модели созревания донорских ооцитов и культивирования эмбрионов *in vitro*. Данная модель позволяет исследовать все этапы доимплантационного развития партеногенов, оценивать их функциональную активность. Жизнеспособность партеногенетических эмбрионов низкая. В значительной мере это обусловлено тем, что не решена фундаментальная проблема регуляции активности генов в онтогенезе [13]. Высокий процент аномалий и смертности партеногенов, отмеченный в работах по партеногенезу и клонированию, может быть обусловлен геномным импринтингом [14, 15]. Разработка технологии получения партеногенетических зародышей животных сопряжена со множеством нерешенных проблем биологии раннего развития. И все же, имеющиеся сведения о получении живого потомства, развившегося из партеногенетических зародышей мышей [5, 6], позволяет определить разработку методов стимуляции ооцитов к партеногенезу, как перспективную новую технологию для получения, как гомозиготных линий эмбриональных стволовых клеток, так и генетически идентичных особей млекопитающих.

Цель исследований — оценка компетентности к партеногенетическому развитию растущих или завершивших фазу роста *in vivo* донорских ооцитов коров, выделенных из фолликулов разного диаметра.

Материалы и методы исследований. При проведении исследований использовали постмортальные яичники коров на стадии фолликулярного роста. Ооцит-кумулюсные комплексы аспирировали из антральных фолликулов 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. До начала культивирования ооциты подвергались ВСВ-диагностике. Для этого ооцит-кумулюсные комплексы отмывали 3 раза в рас-

творе Дюльбекко с добавлением 0,4% бычьего сывороточного альбумина (BSA, A-7888) и помещали в раствор ВСВ (B-5388, Sigma) в концентрации 13 Мм на 60 минут при температуре 38,5°C в атмосфере 90% влажности. По истечении времени воздействия ВСВ ооцит-кумулюсные комплексы дважды отмывали в растворе Дюльбекко, оценивали под бинокулярной лупой и ранжировали на две группы: ооциты с голубой окраской цитоплазмы — ВСВ⁺ (ооциты, завершившие фазу роста) и неокрашенные ооциты без голубой окраски цитоплазмы — ВСВ (растущие ооциты). Культивировали ооцит-кумулюсные комплексы совместно с клетками гранулезы (1×10⁶ клеток гранулезы на мл среды) в среде ТС-199 с добавлением 10% фетальной бычьей сыворотки (ФБС), 50 нг/мл пролактина, 50 мкг/мл гентамицина. Гранулёзные клетки получали путем аспирации жидкости из фолликулов диаметром 3–6 мм с обширной васкуляризацией и высоким тургором и последующим центрифугированием при 250 g 10 мин. После удаления супернатанта клетки 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%-ный раствор). Для культивирования использовали суспензию клеток гранулезы, при этом доля живых клеток составляла не менее 60–80%. Неперспективной для ко-культивирования с ооцитами является популяция клеток гранулезы с более чем 20% пикнотических клеток. Режимы экстракорпорального созревания ооцитов, их оплодотворения и культивирования доимплантационных эмбрионов представлены в методических рекомендациях, разработанных в лаборатории биологии развития ВНИИГРЖ [16]. Индукцию ооцитов к партеногенетическому развитию проводили холодным шоком через 24 часа после начала культивирования [17]. Параметры обработки холодным шоком: температура — 0(–4°)C, экспозиция — 20 минут. После индукции холодным шоком ооциты помещали в синтетическую среду яйцевода (SOF) с 5% фетальной бычьей сыворотки. Стартовый отбор дробящихся зародышей проводили через 48 часов после активации. Для контроля за состоянием хроматина в ооцитах, эмбрионах и клетках кумулюса готовили препараты хромосом по методу Тарковского [18]. Структурно — логическая схема экспериментов представлена на рис. 1.

Все использованные реагенты — производства компании (Sigma-Aldrich, USA). Пластиковая лабораторная посуда фирмы BD Falcon™.

Для сравнения результатов контрольных и опытных групп использовали критерии χ^2 (пакет статистической программы SigmaStat). Достоверность

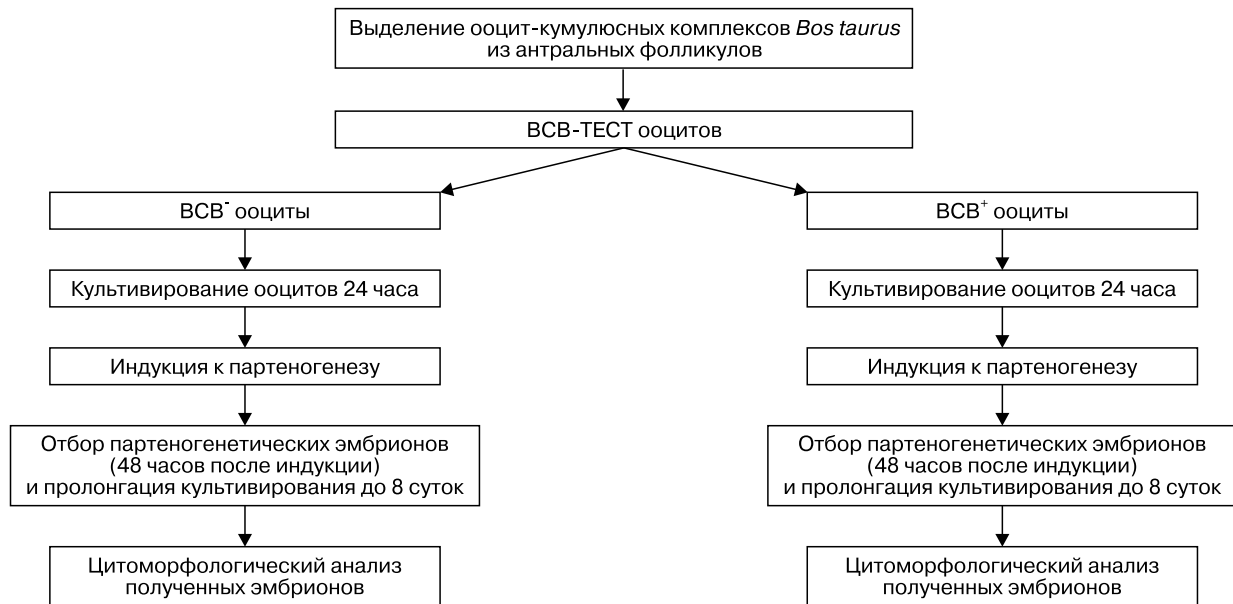


Рис. 1. Структурно-логическая схема экспериментов по получению партеногенетических зародышей коров из ооцитов, подвергшихся BCB-тесту

различия сравниваемых средних значений оценивали при трех уровнях значимости: $P < 0,05$; $P < 0,01$; $P < 0,001$. Эксперименты проведены не менее, чем в 3-х повторностях.

Анализ и обсуждение результатов. Известно, что ооциты коров, выделенные из фолликулов диаметром меньше 3 мм, отличаются низкими компетенциями к созреванию *in vitro* и к оплодотворению [19]. Также обнаружено, что именно в таких фолликулах процент ооцитов, не завершивших фазу роста (BCB-диагностика), значительно превышает таковой в фолликулах большего диаметра. В наших экспериментах исследованы потенции к партеногенетическому развитию гамет, выделенных из фолликулов диаметром <3 мм, 3–5 мм, >5–8 мм. Ооциты, выделенные из фолликулов более 3 мм, показали высокие компетенции к партеногенезу. Доля раздробившихся клеток в группах ооцитов из фолликулов более 3 мм значительно превышала таковую в группе ооцитов из фолликулов менее 3 мм (67% и 87% против 20%, $P < 0,001$; $P < 0,01$, рис. 2). Такая же тенденция отмечена при анализе потенций к развитию партеногенов до стадии бластоцисты. Так, доля партеногенетических эмбрионов на стадии бластоцисты, развившихся из ооцитов, выделенных из фолликулов диаметром от 3 до 5 мм, составила — 22%, диаметром более 5 мм — 37%, в то время, как аналогичный показатель в группе ооцитов из фолликулов менее 3 мм достиг лишь 9%. При морфологическом и цитологическом анализе полученных эмбрионов были зафиксированы различные типы нарушений — лизис бластомеров, неравномерное дробление, вакуолизация, мультинокле-

ция, отсутствие ядер в отдельных бластомерах, нарушение ploидности и др. Уровень партеногенетических эмбрионов с признаками дегенерации в группах активированных ооцитов из фолликулов диаметром менее 3 мм значительно превышал таковой у партеногенов, развившихся из ооцитов, выделенных из фолликулов от 3 до 8 мм (рис. 3).

Основываясь на анализе представленных выше результатов исследований и известных данных о том, что в фолликулах диаметром менее 3 мм находится большое количество ооцитов, не завершивших фазу роста, в следующей серии экспериментов мы протестировали возможность развития партеногенов из ооцитов в зависимости от их функционального статуса (растущие или за-

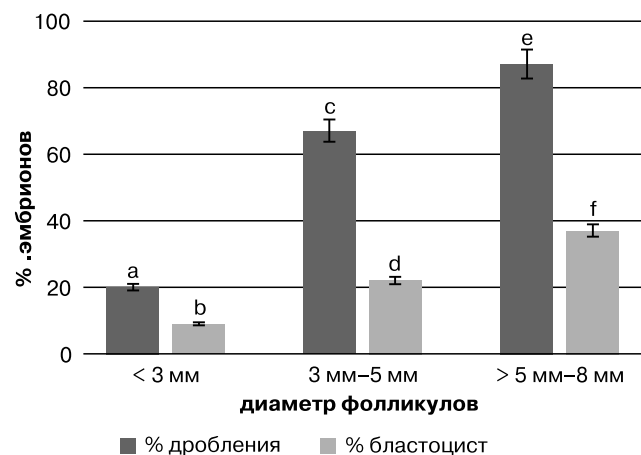


Рис. 2. Потенции к развитию партеногенетических зародышей коров, развившихся из ооцитов, выделенных из фолликулов разного диаметра (n ооцитов — 335, 3 повторности).
Достоверность сравниваемых значений (χ^2 -test): a:c; a:e; b:d; b:f $P < 0,001$; c:e $P < 0,01$

вершившие фазу роста). Актуальность проблемы углубляется в связи с необходимостью разработки точных критериев постовуляторного старения донорской яйцеклетки, а также исследований потенциалов к возможности завершения фазы роста ооцитами *in vitro*. Результаты экспериментов по оценке компетентности ооцитов, предварительно оцененных на степень завершенности фазы роста (BCB-тест), представлены на рис. 4. Исследования выявили значительные потенциалы к партеногенетическому развитию ооцитов, завершивших фазу роста *in vivo* (BCB⁺), по сравнению с ооцитами, находившихся на момент извлечения их из антральных фолликулов в состоянии роста (BCB⁻). Как доля раздробившихся эмбрионов, развившихся из BCB⁺ ооцитов, так и уровень партеногенов, достигших стадии бластоцисты, был значительно выше доли партеногенов, полученных из BCB⁻ ооцитов. Сравнительный анализ процессов дегенерации в исследованных эмбрионах выявил тенденцию к росту доли партеногенов с признаками дегенерации в группах, где активировали ооциты, не завершившие фазу роста.

Предлагаемая модификация этапов получения партеногенетических зародышей, а именно: использование в качестве донорских завершивших фазу роста *in vivo* (BCB-тест) ооциты из антральных фолликулов диаметром более 3 мм позволила увеличить выход партеногенетических зародышей с положительными качественными характеристиками до 87%. Из чего также следует, что ооциты, не завершившие фазу роста *in vivo*, вероятно, не «успевают» завершить ядерно-цитоплазматического созревания *in vitro* в исследуемый промежуток времени (24 часа), т.к. компетент-

ность к завершению мейотического созревания приобретается вслед за завершением фазы роста гаметы. Не следует также исключать возможность апоптотических процессов в ооцитах в силу механизмов фолликулярной селекции.

Выводы. Мониторинг показателей компетентности к партеногенезу ооцитов *Bos Taurus*, выделенных из фолликулов разного диаметра (<3 мм, 3–5 мм, >5–8 мм), выявил низкие потенциалы к индуцированному холодовым шоком партеногенезу ооцитов, выделенных из фолликулов менее 3 мм в диаметре. Функциональный статус (растущие или завершившие фазу роста) ооцитов детерминирует их потенциалы к индуцированному партеногенезу. Завершившие фазу роста ооциты *Bos Taurus* (BCB-тест) обладают высокими потенциалы к индуцированному холодовым шоком партеногенезу, что выражается в значительном росте доли развившихся из них эмбрионов на всех стадиях доимплантационного развития и снижении доли дегенерированных зародышей, по сравнению с аналогичными показателями, полученными при активации ооцитов, не завершивших фазу роста *in vivo*.

Результаты экспериментов могут быть использованы при оптимизации технологий клонирования (холодовой шок, как эффективный индуктор к активации), методов получения партеногенетических зародышей с целью создания линий эмбриональных стволовых клеток заданной ploидности эмбриотехнологами и специалистами центров ЭКО, научно-исследовательских групп и центров, занимающихся проблемами клеточной и репродуктивной биотехнологий в животноводстве, ветеринарии, биомедицине.

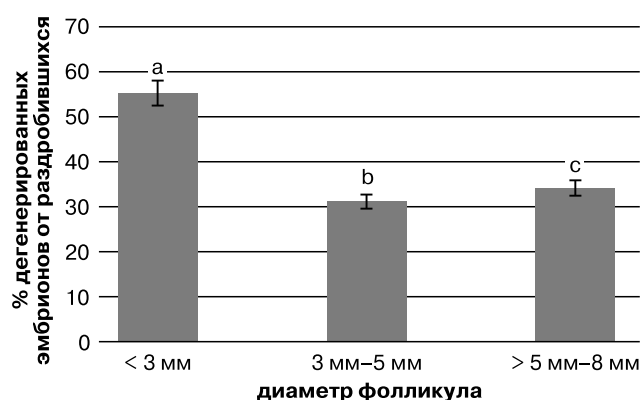


Рис. 3. Морфологическая характеристика партеногенетических эмбрионов коров, развившихся из фолликулов разного диаметра (n ооцитов — 202, 3 повторности).

Достоверность сравниваемых значений (χ^2 -test):^{a:b} P<0,01;^{a:c} P<0,05

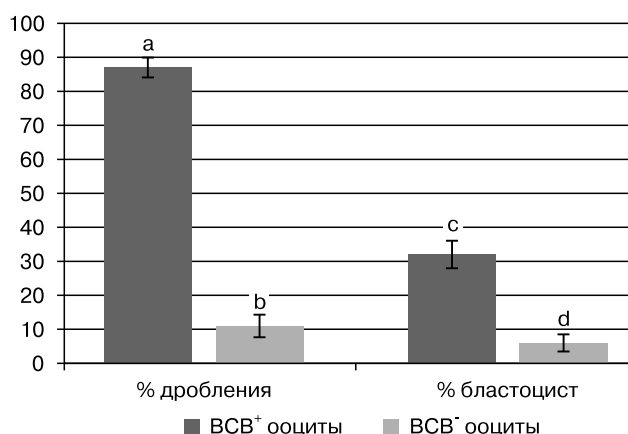


Рис. 4. Потенции к развитию партеногенетических зародышей коров, развившихся из ооцитов в различном функциональном состоянии (число ооцитов — 222, число экспериментов — 3).

Достоверность сравниваемых значений (χ^2 -test):^{a:b,c,d} P<0,001

Работа проведена в рамках выполнения фундаментальных научных исследований Министерства науки и высшего образования РФ по теме №AAAA-A18-118021590132-9

Литература

1. Yum S. Development of genome engineering technologies in cattle: from random to specific / S.-Y. Yum, K.-Y. Youn, W.-J. Choi, G. Jang // *Journal of Animal Science and Biotechnology*. — 2018. — V. 9(16). doi: 10.1186/s40104-018-0232-6.
2. Lagutina I. Developmental Potential of Bovine Androgenetic and Parthenogenetic Embryos: A Comparative Study / I. Lagutina, G. Lazzari, R. Duchi, C. Galli // *Biology of reproduction*. — 2004. — V. 70. — P. 400–405.
3. Bing Y. Parthenogenetic activation and subsequent development of porcine oocytes activated by a combined electric pulse and butyrolactone I treatment / Y. Bing, L. Che, Y. Hirao, N. Takenouchi, H. Rodriguez-Martinez, T. Nagai // *J Reprod Dev*. — 2003. — V. 49(2). — P. 159–166.
4. Camargo L. S. A. Contrasting effects of heat shock during in vitro maturation on development of in vitro-fertilized and parthenogenetic bovine embryos / L. S. A. Camargo, F. Q. Costa, M. Munk, S. Wohlrres-Viana, R. V. Serapio, B. C. Carvalho, P. H. Jr. Campos, A. C. Vieira, L. A. G. Nogueira, J. H. M. Viana // *Reprod. Domest. Anim.* — 2019. — V. 54(10). — P. 1357–1365. doi: 10.1111/rda.13544.
5. Chen Z. Birth of parthenote mice directly from parthenogenetic embryonic stem cells / Z. Chen, Z. Liu, J. Huang, T. Amano, C. Li, S. Cao, C. Wu, B. Liu, L. Zhou, M. G. Carter, D. L. Keefe, X. Yang, L. Liu // *Stem Cells*. — 2009. — V. 27(9). — P. 2136–2145.
6. Kono T. Genomic imprinting is a barrier to parthenogenesis in mammals. // *Cytogenet Genome Res*. — 2006. — V. 113 (1-4). — P. 31–35.
7. Zhong C. Parthenogenetic haploid embryonic stem cells efficiently support mouse generation by oocyte injection / C. Zhong, Z. Xie, Q. Yin, R. Dong, S. Yang, Y. Wu, L. Yang, J. Li // *Cell Research*. — 2016. — V. 26. — P. 131–134. doi: 10.1038/cr.2015.132.
8. Milazzotto M. P. Effect of Chemical or Electrical Activation of Bovine Oocytes on Blastocyst Development and Quality / M. P. Milazzotto, W. B. Feitosa, A. R. S. Coutinho, M. D. Goissis, V. P. Oliveira, M. E. O. A. Assumpção, J. A. Visintin // *Reprod. Dom. Anim.* — 2008. — V. 43. — P. 319–322.
9. Carneiro G. Influence of Insulin-Like Growth Factor-I and Its Interaction with Gonadotropins, Estradiol, and Fetal Calf Serum on In Vitro Maturation and Parthenogenic Development in Equine Oocytes / G. Carneiro, P. Lorenzo, C. Pimentel, L. Pegoraro, M. Bertolini, B. Ball, G. Anderson, I. Liu // *Biology of reproduction*. — 2001. — V. 65. — P. 899–905.
10. Somfai T. Diploid porcine parthenotes produced by inhibition of first polar body extrusion during in vitro maturation of follicular oocytes / T. Somfai, M. Ozawa, J. Noguchi, H. Kaneko, K. Ohnuma, N. W. Karja, M. Fahrudin, N. Maedomari, A. Dinnyes, T. Nagai, K. Kikuchi // *Reprod.* — 2006. — V. 132(4). — P. 559–570.
11. Yoshida M. Blastocyst formation by pig embryos resulting from in-vitro fertilization of oocytes matured in vitro / M. Yoshida, Y. Ishizaki, H. Kawagishi // *J Reprod. Fertil.* — 1990. — V. 88. — P. 1–8.
12. Zuo Z. The effects of glycine-glutamine dipeptide replaced l-glutamine on bovine parthenogenetic and IVF embryo development / Z. Zuo, Z. Niu, Z. Liu, J. Ma, P. Qu, F. Qiao, J. Su, Y. Zhang, Y. Wang. // *Theriogenology*. — 2020. — V. 141. — P. 82–90. doi: 10.1016/j.theriogenology.2019.09.005.
13. Платонов Е. С. Влияние ростовых факторов FGF4, TGFα и TGFβ1 на развитие партеногенетических эмбрионов мышей C57BL/6 / Е. С. Платонов, Л. И. Пенков, Б. Д. Димитров, О. В. Миронова, Б. В. Конюхов // *Онтогенез*. — 2005. — Т. 36(2). — С. 144–149.
14. Kono T. Birth of parthenogenetic mice that can develop to adulthood / T. Kono, Y. Obata, Q. Wu // *Nature*. — 2004. — V. 428(6985). — P. 860–864.
15. Smith L. C. Epigenetic consequences of artificial reproductive technologies to the bovine imprinted genes SNRPN, H19/IGF2, and IGF2R / L. C. Smith, J. Therrien, F. Filion, F. Bressan, F. V. Meirelles // *Frontiers in Genetics*. — 2015. — V. 6(58). doi: 10.3389/fgene.2015.00058.
16. Кузьмина Т. И. Биотехнология получения эмбрионов крупного рогатого скота in vitro (методические рекомендации) / Т. И. Кузьмина, В. А. Багиров, А. В. Егиазарян, Х. Альм, Х. Торнер // Санкт-Петербург-Пушкин. — 2009. — С. 44.
17. Эрнст Л. К., Голубев А. К., Кудрявцев И. В., Кузьмина Т. И. и соавт. Способ получения партеногенетических зародышей. СССР патент № 1086808. 1983.
18. Alm H. Bovine Blastocyst Development Rate in vitro Is Influenced by Selection of Oocytes by Brilliant Cresyl Blue Staining Before IVM as Indicator for Glucose 6 Phosphate Dehydrogenase activity / H. Alm, H. Torner, B. Lohrke, et al. // *Theriogenology*. — 2005. — V. 63. — P. 2194–2205.
19. Tarkowski A. An air-drying method for chromosomal preparation from mouse eggs / A. Tarkowski // *Cytogenetic*. — 1966. — №1. — P. 394–400.

Kuzmina T., Alm H.

Competence to induced parthenogenesis of *Bos Taurus* oocytes, depending on the gamete functional status and its origin (follicle diameter)

Abstract. *The development of effective methods for obtaining parthenogenetic embryos is currently being considered in a new perspective as a promising technology for creating homozygous lines of embryonic stem cells, genetically identical animals. Parthenogenetic embryos of animals of different species are used as a model for studying imprinting mechanisms. In the present study, Bos Taurus parthenogenetic embryos were obtained by cold shock induction (exposure for 20 minutes at a temperature of -0-(-4) °C) of after oocytes culture in TC-119 medium with 10% fetal bovine serum, 50 ng / ml prolactin, 50 µg / ml of gentamicin together with 1×10⁶ granulosa cells per ml of medium for 24 hours. Previously, the initial population of donor oocytes from the ovaries was evaluated with BCB test to assess functional status. For this, the oocyte-cumulus complexes were placed in a solution of 13 Mm brilliant crystalline blue — BCB (B-5388, Sigma) for 60 minutes at a temperature of 38.5 °C in an atmosphere of 90% humidity. After the expiration of the BCB exposure time, the oocytes were ranked as follows: oocytes with a blue cytoplasm — BCB⁺ oocytes (oocytes that completed their growth phase) and oocytes with unpainted ooplasm — BCB⁻ oocytes (growing oocytes). It was found that the functional status (growing oocytes or oocytes that have finished growth phase) of oocytes and their origin (the diameter of the follicles from which the gametes were isolated) determine their competence for induced parthenogenesis.*

Oocytes that completed the growth phase have high potentials to cold shock-induced parthenogenesis, which is expressed in a significant increase in the proportion of embryos developed from them at all stages of preimplantation development (percentage of cleavage: 87% vs 11%, $P < 0.001$; level of late morula, blastocysts: 32% vs 6%, $P < 0.001$). Monitoring of competency indicators to parthenogenesis of Bos Taurus oocytes isolated from follicles of different diameters (<3 mm, 3–5 mm, > 5–8 mm) revealed low competence to cold shock-induced parthenogenesis of oocytes isolated from follicles less than 3 mm in diameter (the percentage of cleavage: 20% vs 67% and 87%, $P < 0.001$, respectively; level of late morula, blastocysts: 9% vs 22% and 37%, $P < 0.001$, respectively).

Key words: parthenogenesis, oocytes, in vitro maturation, BCB-test, Bos Taurus.

Authors:

Kuzmina T. — Dr. Habil. (Biol. Sci.), Russian research institute of farm animal genetics and breeding — branch of the L. K. Ernst Federal science center for animal husbandry; Russia, St. Petersburg, Pushkin, Moskovskoe shosse, 55a, 196601; e-mail: prof.kouzmina@mail.ru;

Alm Hanna — PhD (Biology), Leibniz Institute for Farm Animal Biology (FBN), Wilhelm-Stahl-Allee 2, 18196, Dummerstorf, Germany; e-mail: ca.alm@t-online.de.

References

1. Yum S. Development of genome engineering technologies in cattle: from random to specific / S.-Y. Yum, K.-Y. Youn, W.-J. Choi, G. Jang // Journal of Animal Science and Biotechnology. — 2018. — V. 9(16). doi: 10.1186/s40104-018-0232-6.
2. Lagutina I. Developmental Potential of Bovine Androgenetic and Parthenogenetic Embryos: A Comparative Study / I. Lagutina, G. Lazzari, R. Duchi, C. Galli // Biology of reproduction. — 2004. — V. 70. — P. 400–405.
3. Bing Y. Parthenogenetic activation and subsequent development of porcine oocytes activated by a combined electric pulse and butyrolactone I treatment / Y. Bing, L. Che, Y. Hirao, N. Takenouchi, H. Rodríguez-Martínez, T. Nagai // J Reprod Dev. — 2003. — V. 49 (2). — P. 159–166.
4. Camargo L. S. A. Contrasting effects of heat shock during in vitro maturation on development of in vitro-fertilized and parthenogenetic bovine embryos / L. S. A. Camargo, F. Q. Costa, M. Munk, S. Wohlres-Viana, R. V. Serapio, B. C. Carvalho, P. H. Jr. Campos, A. C. Vieira, L. A. G. Nogueira, J. H. M. Viana // Reprod. Domest. Anim. — 2019. — V. 54(10). — P. 1357–1365. doi: 10.1111/rda.13544.

5. Chen Z. Birth of parthenote mice directly from parthenogenetic embryonic stem cells / Z. Chen, Z. Liu, J. Huang, T. Amano, C. Li, S. Cao, C. Wu, B. Liu, L. Zhou, M.G. Carter, D.L. Keefe, X. Yang, L. Liu // *Stem Cells*. — 2009. — V. 27(9). — P. 2136-2145.
6. Kono T. Genomic imprinting is a barrier to parthenogenesis in mammals. // *Cytogenet Genome Res.* — 2006. — V. 113(1-4). — P. 31-35.
7. Zhong C. Parthenogenetic haploid embryonic stem cells efficiently support mouse generation by oocyte injection / C. Zhong, Z. Xie, Q. Yin, R. Dong, S. Yang, Y. Wu, L. Yang, J. Li // *Cell Research*. — 2016. — V. 26. — P. 131-134. doi: 10.1038/cr.2015.132.
8. Milazzotto M. P. Effect of Chemical or Electrical Activation of Bovine Oocytes on Blastocyst Development and Quality / M. P. Milazzotto, W. B. Feitosa, A. R. S. Coutinho, M. D. Goissis, V. P. Oliveira, M. E. O. A. Assumpção, J. A. Visintin // *Reprod. Dom. Anim.* — 2008. — V. 43. — P. 319-322.
9. Carneiro G. Influence of Insulin-Like Growth Factor-I and Its Interaction with Gonadotropins, Estradiol, and Fetal Calf Serum on In Vitro Maturation and Parthenogenic Development in Equine Oocytes / G. Carneiro, P. Lorenzo, C. Pimentel, L. Pegoraro, M. Bertolini, B. Ball, G. Anderson, I. Liu // *Biology of reproduction*. — 2001. — V. 65. — P. 899-905.
10. Somfai T. Diploid porcine parthenotes produced by inhibition of first polar body extrusion during in vitro maturation of follicular oocytes / T. Somfai, M. Ozawa, J. Noguchi, H. Kaneko, K. Ohnuma, N. W. Karja, M. Fahrudin, N. Maedomari, A. Dinnyes, T. Nagai, K. Kikuchi // *Reprod.* — 2006. — V. 132(4). — P. 559-570.
11. Yoshida M. Blastocyst formation by pig embryos resulting from in-vitro fertilization of oocytes matured in vitro / M. Yoshida, Y. Ishizaki, H. Kawagishi // *J Reprod. Fertil.* — 1990. — V. 88. — P. 1-8.
12. Zuo Z. The effects of glycine-glutamine dipeptide replaced l-glutamine on bovine parthenogenetic and IVF embryo development / Z. Zuo, Z. Niu, Z. Liu, J. Ma, P. Qu, F. Qiao, J. Su, Y. Zhang, Y. Wang. // *Theriogenology*. — 2020. — V. 141. — P. 82-90. doi: 10.1016/j.theriogenology.2019.09.005.
13. Platonov E. S. The influence of growth factors FGF4, TGF α and TGF β 1 on the development of parthenogenetic mouse embryos C57BL / 6 / E.S. Platonov, L. I. Penkov, B. D. Dimitrov, O. V. Mironova, B. V. Konyukhov // *Ontogenesis*. — 2005. — V. 36(2). — P. 144-149.
14. Kono T. Birth of parthenogenetic mice that can develop to adulthood / T. Kono, Y. Obata, Q. Wu // *Nature*. — 2004. — V. 428(6985). — P. 860-864.
15. Smith L. C. Epigenetic consequences of artificial reproductive technologies to the bovine imprinted genes SNRPN, H19/IGF2, and IGF2R / L. C. Smith, J. Therrien, F. Filion, F. Bressan, F. V. Meirelles // *Frontiers in Genetics*. — 2015. — V. 6(58). doi: 10.3389/fgene.2015.00058.
16. Kuzmina T. I. Biotechnology for production of cattle embryos in vitro (guidelines) / T. I. Kuzmina, V. A. Bagirov, A. V. Egiazaryan, H. Alm, H. Torner // *St. Petersburg-Pushkin*. — 2009. — P. 44.
17. Ernst L. K., Golubev A. K., Kudryavtsev I. V., Kuzmina T. I. et al. A method of obtaining of parthenogenetic embryos. USSR patent No. 1086808. 1983.
18. Alm H. Bovine Blastocyst Development Rate in vitro Is Influenced by Selection of Oocytes by Brilliant Cresyl Blue Staining Before IVM as Indicator for Glucose 6 Phosphate Dehydrogenase activity / H. Alm, H. Torner, B. Lohrke, et al. // *Theriogenology*. — 2005. — V. 63. — P. 2194-2205.
19. Tarkowski A. An air-drying method for chromosomal preparation from mouse eggs / A. Tarkowski // *Cytogenetic*. — 1966. — № 1. — P. 394-400.