

А. В. Лопухов

Влияние условий пост-активационного культивирования на развитие партеногенетических эмбрионов крупного рогатого скота

Аннотация.

Цель: провести сравнительный анализ влияния коммерческих сред BO-IVC и CR1aa на этапе пост-активационного и последующего культивирования искусственно активированных ооцитов на формирование и качество партеногенетических эмбрионов крупного рогатого скота.

Материалы и методы. Через 22 часа *in vitro* созревания ооциты с первым полярным тельцем активировали в 5 мМ растворе иономицина (5 мин), после чего дополнительно культивировали в течение 4 часов с 2 мМ 6-диметиламинопурином (6-ДМАП) и 10 мкг/мл циклогексимида в среде CR1aa или BO-IVC (IVF Bio-science, Великобритания). После окончания периода пост-активационного культивирования одна часть ооцитов, культивируемых в среде CR1aa, переносилась для дальнейшего эмбрионального развития в среду аналогичного состава (группа CR1aa/CR1aa), другая часть в среду BO-IVC (группа CR1aa/BO-IVC). Активированные ооциты, культивируемые в присутствии 6-ДМАП и циклогексимида в среде BO-IVC, переносились в среду BO-IVC (группа BO-IVC/BO-IVC). Через 3 суток после активации оценивали число раздробившихся ооцитов, на 7 день оценивали количество эмбрионов, развившихся до стадии поздней морулы и бластоцисты, а также определяли число ядер в эмбрионах с помощью цитологического анализа.

Результаты. Доля раздробившихся ооцитов не различалась между экспериментальными группами и варьировала от 73,0 до 76,5%. Также не обнаружено значимого влияния условий пост-активационного культивирования ооцитов на их развитие до стадии поздней морулы и бластоцисты, выход которых для групп CR1aa/CR1aa, CR1aa/BO-IVC и BO-IVC/BO-IVC составил $28,9 \pm 1,7$, $40,4 \pm 7,5$ и $36,0 \pm 6,4$ %, соответственно. Тем не менее выявлено влияние тестируемых условий на способность партеногенетических эмбрионов преодолевать 8-16 клеточный блок развития и на их качество на поздних стадиях развития. Доля эмбрионов, содержащих менее 16-ти ядер, в группе CR1aa/CR1aa была наибольшей и составляла $56,8 \pm 2,1$ %. Смена среды CR1aa на среду BO-IVC (группа BO-IVC/BO-IVC) достоверно снижала данный уровень ($p < 0,05$). Положительный эффект усиливался, когда на этапе культивирования в присутствии 6-ДМАП и циклогексимида использовалась среда CR1aa, а дальнейшее эмбриональное развитие происходило в среде BO-IVC (группа CR1aa/BO-IVC) ($p < 0,001$). Кроме того, при использовании смешанного варианта повышалось среднее количество ядер в партеногенетических эмбрионах, достигших стадии поздней морулы/бластоцисты ($p < 0,05$).

Заключение. Таким образом, среда BO-IVC на этапах пост-активации и дальнейшего развития искусственно активированных ооцитов коров по эффективности получения партеногенетических эмбрионов на стадии бластоцисты сравнима со средой CR1aa. Тем не менее ее замена на этапе пост-активации на среду CR1aa позволяет повысить качество партеногенетических эмбрионов.

Ключевые слова: крупный рогатый скот, партеногенетические эмбрионы, условия культивирования.

Авторы:

Лопухов Александр Викторович – научный сотрудник; e-mail: vubi_myaso@mail.ru.

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный исследовательский центр животноводства – ВИЖ имени академика Л. К. Эрнста», 142132, Россия, Московская область, городской округ Подольск, поселок Дубровицы, д. 60.

Введение. Искусственная активация является ключевым этапом получения партеногенетических эмбрионов и технологии клонирования методом переноса ядер соматических клеток (somatic cell nuclear transfer, SCNT) [1-3]. Как известно, обе эти процедуры не подразумевают

использования сперматозоидов для завершения мейоза и побуждения цитогбрида (слившегося с донорской соматической клеткой энуклеированного ооцита-реципиента) к дальнейшему развитию. Данное обстоятельство является основанием для применения специальных химических

активационных агентов, которые отчасти имитируют процессы, происходящие в ооплазме созревшего ооцита в ходе оплодотворения *in vitro* (*in vitro fertilization*, IVF) [4, 5].

Ооциты млекопитающих после созревания *in vitro* находятся в состоянии мейотического ареста на стадии МII, который обусловлен активностью фактора промоции созревания (MPF) и митоген-активированных протеинкиназ (МАРК/ERK) [6, 7]. Для активации реконструированных ооцитов крупного рогатого скота наиболее часто используют химические агенты иономицин и ионофор кальция A23187, индуцирующие колебания ионов Ca^{2+} в ооплазме и, как следствие, ингибирование MPF и МАРК, запуск ранних событий активации, возобновление мейоза и начало эмбрионального развития [8, 9]. Однако такая химическая стимуляция, с одной стороны, вызывает однократное и непродолжительное увеличение концентрации внутриклеточного кальция, а с другой, в должной мере не подавляет волнообразные процессы деградации и синтеза циклина Б - регуляторной субъединицы MPF, ответственной за поддержание его активности на стадии МII [10].

По этой причине во многих исследованиях для получения партеногенетических и клонированных эмбрионов находит свое применение стратегия пост-активационного культивирования, кото-

рая подразумевает дополнительную инкубацию ооцитов совместно с экзогенными химическими соединениями, усиливающими стимуляцию активации после окончания воздействия основного активирующего сигнала [11]. Большинство протоколов искусственной активации ооцитов крупного рогатого скота включают культивирование активированных ооцитов на стадии МII с 6-диметиламинопурином (6-ДМАП), подавляющим активность протеинкиназ, и/или с циклогексимидом, блокирующим реактивацию циклина Б [12, 13]. Пост-активационное культивирование, продолжительность которого у данного вида животных, как правило, составляет 4-5 часов, позволяет повысить эффективность активации, способствует завершению мейоза и инициации эмбрионального клеточного цикла [8].

Культивирование половых клеток в присутствии химических агентов, стимулирующих искусственную активацию, происходит, как известно, в специальных средах. У крупного рогатого скота для этих целей чаще всего используют среды SOF, CR1aa и IVD101 [14-20], которые готовятся в условиях каждой лаборатории самостоятельно. В собственных исследованиях для получения партеногенетических и клонированных эмбрионов крупного рогатого скота нами также применяется одна из этих сред, а именно среда CR1aa [13, 21, 22]. Среда пост-активационного

Таблица 1. Оценка созревания ооцитов, используемых для получения партеногенетических эмбрионов с применением различных сред пост-активационного культивирования и последующего эмбрионального развития

Среда постактива- ционного культивирования	Среда эмбриональ- ного развития	Число экспериментов	Число ОКК, n	Доля ооцитов с ППТ, %
BO-IVC	BO-IVC	5	119	72,5±4,3
CR1aa	BO-IVC	5	111	71,5±3,1
CR1aa	CR1aa	5	115	75,4±3,5

Таблица 2. Влияние сред пост-активационного и эмбрионального культивирования на развитие партеногенетических эмбрионов крупного рогатого скота

Среда пост-акти- вационного куль- тивирования	Среда эмбрио- нального развития	Число ооци- тов с ППТ, n	Доля раздро- бившихся ооци- тов, n (%)	Доля эмбрионов от числа раздробив- шихся, %	
				Содержащих менее 16-ти ядер	На стадии поздней морулы и бластоцисты
BO-IVC	BO-IVC	86	59 (73,5±7,2)	40,9±6,7 ^a	36,0±6,4
CR1aa	BO-IVC	79	61 (76,5±6,1)	21,8±4,5 ^b	40,4±7,5
CR1aa	CR1aa	87	64 (73,0±2,7)	56,8±2,1 ^{ab}	28,9±1,7

Примечание. ^{b,ab}p<0,001; ^ap<0,05 — достоверность различий между сравниваемыми группами.

культивирования чаще всего имеет тот же состав, что и среда для эмбрионального развития.

В последнее время для культивирования эмбрионов крупного рогатого скота *in vitro* все чаще стали использоваться коммерческие среды. Их применение упрощает процедуру получения эмбрионов, позволяет стандартизировать условия их культивирования *in vitro* и обеспечивает высокий выход эмбрионов предимплантационных стадий развития после IVF [23]. Наиболее популярной коммерческой средой является среда BO-IVC (IVF Bioscience, Великобритания) [24, 25]. Показано также, что культивирование в данной среде обеспечивает более высокие показатели развития оплодотворенных *in vitro* ооцитов коров до стадии бластоцисты, чем в среде SOF, и повышение их качества [26].

В рамках настоящей работы, учитывая преимущества и высокую результативность использования среды BO-IVC для получения эмбрионов крупного рогатого скота после IVF, была проведена оценка возможности ее применения для культивирования искусственно активированных ооцитов. Впервые изучено влияние данной среды в период их пост-активационного и последующего культивирования по сравнению со средой CR1aa на формирование партеногенетических эмбрионов и их качество.

Материалы и методы. Источником ооцитов крупного рогатого скота служили яичники коров и половозрелых телок после убоя на мясокомбинате, которые были транспортированы в лабораторию в термосе с теплым физиологическим раствором при температуре 32-35°C в течение 3-4 часов. Доставленные яичники препарировали, удаляя лишние ткани, и многократно отмывали в стерильном физиологическом растворе с антибиотиками (100 МЕ пенициллина и 50 мкг/мл стрептомицина). Ооциты в составе ооцит-кумуляных комплексов (ОКК) выделяли путем расщепления лезвием стенок фолликулов и промывали 3 раза в среде TC-199, содержащей 5%

фетальной бычьей сыворотки (ФБС), 0,5 мМ пирувата натрия, 10 мкг/мл гепарина и 50 мкг/мл гентамицина. Для экспериментов отбирали ооциты округлой формы с гомогенной цитоплазмой, равномерной по ширине зоной пеллюциды, окруженные многослойным компактным кумулюсом. После селекции отобранные ОКК культивировали с целью созревания группами по 20-25 шт. в 500 мкл среды TC-199, содержащей 10% ФБС, 0,5 мМ пируват натрия, гентамицин (50 мкг/мл), фолликулостимулирующий гормон (10 мкг/мл) и лютеонизирующий гормон (10 мкг/мл) при 38,5°C, 90% влажности и 5% CO₂ в атмосфере.

После 22 часов созревания ооциты освобождали от клеток кумулюса посредством инкубации ОКК в 0,1% растворе гиалуронидазы в течение 1 мин при 37°C, последующей дезагрегации комплексов пипетированием и многократного промыва изолированных яйцеклеток. В процессе последнего промыва ооцитов проводили их морфологическую оценку, отбирая клетки с первым полярным тельцем (ППТ). Для приготовления раствора гиалуронидазы, а также для процедуры промыва изолированных ооцитов использовали среду TC-199, содержащую 10 % ФБС, 0,5 мМ пирувата натрия и 50 мкг/мл гентамицина.

Отобранные ооциты с ППТ искусственно активировали посредством культивирования в присутствии 5 мМ иономицина в течение 5 минут. Для активации использовалась предварительно уравновешенная в течение 2 часов в условиях инкубатора при температуре 38,5°C и 5 % CO₂ в атмосфере среда, состоящая из 114 мМ NaCl, 3,1 мМ KCl, 0,4 мМ NaH₂PO₄·2H₂O, 2 мМ CaCl₂·2H₂O, 0,5 мМ MgCl₂·6H₂O, 25 мМ NaHCO₃, 10 мМ HEPES, 15 мМ лактата натрия, 0,25 мМ пирувата натрия, 5 мМ глюкозы, 3 мг/мл бычьего сывороточного альбумина и 50 мкг/мл гентамицина (Hepes-buffered Tyrode's solution, HbT). Активированные клетки тщательно отмывали от иономицина, переносили в среду CR1aa или BO-IVC, содержащих 2 мМ 6-ДМАП

Таблица 3. Результаты цитологического анализа партеногенетических эмбрионов крупного рогатого скота, полученных с использованием различных сред пост-активационного культивирования и последующего эмбрионального развития

Среда пост-активационного культивирования	Среда эмбрионального развития	Число морул и бластоцист, n	Среднее число ядер в морулах и бластоцистах, n
BO-IVC	BO-IVC	21	57,3±3,8 ^a
CR1aa	BO-IVC	22	75,6±6,6 ^b
CR1aa	CR1aa	19	60,2±3,9 ^{ab}

Примечание. ^{b,ab}p<0,001; ^{a,b}p<0,05 — достоверность различий между сравниваемыми группами.

и 10 мкг/мл циклогексимида, и культивировали в течение 4 часов. После окончания периода пост-активационного культивирования одна группа ооцитов, культивируемых в среде CR1aa, переносилась для дальнейшего эмбрионального развития в среду аналогичного состава, другая группа в среду BO-IVC. Активированные ооциты, культивируемые в присутствии 6-ДМАП и циклогексимида в среде BO-IVC, переносились в среду BO-IVC.

Эмбриональное развитие происходило в 4-х луночных планшетах в каплях среды объемом 500 мкл (CR1aa или BO-IVC), покрытых равным количеством минерального масла. Через 3 суток после активации осуществляли смену среды и морфологическую оценку эмбрионов, завершивших первое деление дробления, на 7-е сутки эмбрионы, содержащие более 2-х клеток, использовали для цитологического анализа.

Эмбрионы, прошедшие стадию дробления, фиксировали в 4% растворе параформальдегида в течение 30 минут при комнатной температуре. По завершении фиксации эмбрионы окрашивали в растворе DAPI (1 мкг/мл) с целью локализации хромосом, после чего переносили на предметное стекло и заключали в среду Vectashield («Vector Laboratories», Великобритания). Полученные цитологические препараты оценивали под контролем микроскопа Nikon Eclipse Ti-U («Nikon», Япония) при увеличении $\times 400$, с использованием флуоресцентного фильтра для DAPI (диапазон возбуждения 340-380 нм) и цифровой камеры Nikon DS-Fi3 с применением программного обеспечения NIS-Elements. Определяли количество эмбрионов, содержащих менее 16 клеток, то есть не прошедших блок развития, а также эмбрионов, достигших к 7-му дню культивирования стадии поздней морулы и бластоцисты и подсчитывали число ядер в них.

Данные обрабатывали однофакторным дисперсионным анализом (one-way Anova) с использованием программного обеспечения SigmaStat («Systat Software, Inc.», США). Результаты экспериментов представлены в виде средних значений (M) и стандартных ошибок средних ($\pm$ SEM). Для оценки достоверности различий между сравниваемыми средними значениями использовали критерий Тьюки ($p < 0,05$).

Результаты и обсуждение. Дополнительное культивирование совместно с пост-активационными агентами стимулирует снижение уровня MPF у активированных ооцитов и, как следствие, преодоление блока мейоза на стадии MII, что наряду с действием основного активирующего сигнала способствует успешному развитию

партеногенетических эмбрионов, а также эмбрионов после процедуры SCNT [8, 11]. Тем не менее есть подтверждение, что состав среды пост-активационного культивирования может корректировать это положительное влияние [27]. Также очевидно, что условия *in vitro*, в которых происходит развитие ооцитов после искусственной активации, до сих пор остаются субоптимальными и требуют детализации [28].

С этой целью в данной работе пост-активационное культивирование ооцитов коров происходило в присутствии факторов стимуляции активации 6-ДМАП и циклогексимида и предполагало использование либо среды CR1aa, либо коммерческой среды BO-IVC. При выборе среды CR1aa руководствовались собственным опытом работы с указанной средой [13, 22, 23], а также имеющимися в литературе данными других авторов о ее использовании для культивирования искусственно активированных ооцитов коров [29, 30]. Среда BO-IVC была выбрана на основании сообщений о ее высокой эффективности в работах по получению эмбрионов у крупного рогатого скота после IVF [26]. Для дальнейшего эмбрионального развития в каждом случае применяли те же среды, что и для пост-активационного культивирования (группа CR1aa/CR1aa и группа BO-IVC/BO-IVC), а также смешанный вариант: культивирование в присутствии 6-ДМАП и циклогексимида в среде CR1aa, дальнейшее эмбриональное развитие в среде BO-IVC (группа CR1aa/BO-IVC). В последнем варианте сделано предположение, что коммерческая среда может не подходить для пост-активационного культивирования ооцитов коров.

Всего было проведено 5 серий независимых экспериментов. Используемые для получения партеногенетических эмбрионов созревшие *in vitro* ооциты имели равноценные для дальнейшего развития компетенции. Доля созревших ооцитов (отношение ооцитов с полярными тельцами к исходному количеству ОКК, определяемое в процессе освобождения яйцеклеток от кумулюсных клеток через 22 часа их культивирования) была одинакова и составляла в среднем 73,1% (табл. 1).

Было исследовано воздействие среды пост-активационного и эмбрионального культивирования на развитие искусственно активированных ооцитов до стадий поздняя морула/бластоциста. Доля раздробившихся ооцитов не различалась между экспериментальными группами и варьировала от 73,0 до 76,5%. Кроме того, не выявлено значимого влияния условий пост-активационного культивирования ооцитов на развитие 2-х клеточных эмбрионов до стадии поздней мо-

рулы и бластоцисты, выход которых для групп CR1aa/CR1aa, CR1aa/BO-IVC и BO-IVC/BO-IVC составил $28,9 \pm 1,7$, $40,4 \pm 7,5$ и $36,0 \pm 6,4\%$, соответственно.

Компетенцию полученных партеногенетических эмбрионов к развитию *in vitro* также оценивали по их способности преодолевать 8-16 клеточный блок развития. Как показано в таблице 2, доля эмбрионов, содержащих менее 16-ти ядер, в группе CR1aa/CR1aa (когда на этапах пост-активации и дальнейшего развития использовалась одна среда CR1aa) была наибольшей и составляла $56,8 \pm 2,1\%$. Смена среды CR1aa на коммерческую среду BO-IVC (группа BO-IVC/BO-IVC) достоверно снижала данный уровень ($p < 0,05$). Положительный эффект усиливался, когда на этапе культивирования в присутствии 6-ДМАП и циклогексимида использовалась среда CR1aa, а дальнейшее эмбриональное развитие происходило в среде BO-IVC (группа CR1aa/BO-IVC) ($p < 0,001$).

Использование тестируемых условий также влияло на качество партеногенетических эмбрионов на стадиях поздней морулы/бластоцисты (табл. 3). Цитологический анализ показал, что при смешанном варианте культивирования с инкубацией в первые 4 часа в среде CR1aa с 6-ДМАП и циклогексимидом и последующим переносом в среду BO-IVC (группа CR1aa/BO-IVC) среднее число ядер в поздних морулах и бластоцистах было выше, чем при проведении пост-активации и культивирования только в среде BO-IVC ($p < 0,05$) (табл. 3). При этом достоверных различий между группами CR1aa/CR1aa и BO-IVC/BO-IVC выявлено не было.

Культивирование половых клеток в присутствии химических агентов, стимулирующих искусственную активацию, происходит, как сказано выше, в специальных средах. При этом среда пост-активационного культивирования чаще всего имеет тот же состав, что и среда для эмбрионального развития [14-22]. Однако есть и другой подход, предполагающий культивирование в присутствии активирующих агентов в среде от-

личного состава, то есть смешанный вариант [31-33]. В данном эксперименте не выявлено различий по формированию партеногенетических эмбрионов крупного рогатого скота в результате их культивирования в средах BO-IVC и CR1aa. При этом смешанный вариант культивирования искусственно активированных ооцитов с пост-активацией в присутствии 6-ДМАП и циклогексимида в среде CR1aa и последующим эмбриональным развитием в среде BO-IVC несмотря на то, что также не влиял на выход поздних морул/бластоцист, тем не менее способствовал повышению уровня активации эмбрионального генома и получению партеногенетических эмбрионов более высокого качества, чем в случае использования для этих целей одной из указанных сред. Возможно, условия культивирования в среде BO-IVC являются не совсем адекватными для пост-активации искусственно активированных ооцитов коров, и, как следствие, это не позволяет в полной мере оценить ее преимущества с точки зрения поддержания эмбрионального развития в условиях *in vitro*, как это наблюдалось в случае получения IVP эмбрионов методом экстракорпорального оплодотворения [26].

Заключение. Таким образом, среда BO-IVC на этапах пост-активации и дальнейшего развития искусственно активированных ооцитов коров по эффективности получения партеногенетических эмбрионов на стадии бластоцисты сравнима со средой CR1aa. Тем не менее ее замена на этапе пост-активации на среду CR1aa приводит к повышению способности партеногенетических эмбрионов преодолевать блок развития, а также улучшает их качество. То есть среда CR1aa на данный период культивирования является более оптимальной, чем среда BO-IVC. Вероятно, что в случае использования для культивирования партеногенетических эмбрионов среды BO-IVC лучше использовать смешанный вариант, предполагающий культивирование в присутствии 6-ДМАП и циклогексимида в среде CR1aa, а дальнейшее эмбриональное развитие в среде BO-IVC.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования РФ тема № 0445-2021-0004

Литература

1. Wilmut I. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells / I. Wilmut, A. E. Schnieke et. al. // Nature. — 1997. — Vol. 385(6619). — P. 810-813. doi: 10.1038/385810a0.
2. Rho G. J. Activation regimens to prepare bovine oocytes for intracytoplasmic sperm injection / G. J. Rho, B. Wu et. al. // Mol. Reprod. Dev. — 1998. — Vol. 50. — P. 485-492.
3. Suv6 M. Effect of single and combined treatments with MPF or MAPK inhibitors on parthenogenetic haploid activation of bovine oocytes / M. Suv6, N. G. Canel, D. F. Salamone // Reprod. Biol. — 2019. — Vol. 19(4). — P. 386-393. doi: 10.1016/j.repbio.2019.09.001.

4. Im G. S. Development and apoptosis of pre-implantation porcine nuclear transfer embryos activated with different combination of chemicals / G. S. Im, J. S. Seo, I. S. Hwang, D. H. Kim, S.W. Kim, B.C. Yang, B.S. Yang, L. Lai, R.S. Prather // *Mol. Reprod. Dev.* — 2006. — Vol. 73(9). — P. 1094-1101.
5. Malin K. The many problems of somatic cell nuclear transfer in reproductive cloning of mammals / K. Malin, O. Witkowska-Piłaszewicz, K. Papis // *Theriogenology*. — 2022. — Vol. 189. — P. 246-254. doi: 10.1016/j.theriogenology.2022.06.030.
6. Fan H. Y. Involvement of mitogen-activated protein kinase cascade during oocyte maturation and fertilization in mammals / H. Y. Fan, Q. Y. Sun // *Biol. Reprod.* — 2004. — Vol. 70(3). — P. 535-547. doi: 10.1095/biolreprod.103.022830.
7. Koo D. B. Inactivation of MPF and MAP kinase by single electrical stimulus for parthenogenetic development of porcine oocytes / D. B. Koo, J. I. Chae, J. S. Kim, G. Wee, B. S. Song, K. K. Lee, Y. M. Han // *Mol. Reprod. Dev.* — 2005. — Vol. 72(4). — P. 542-549. doi: 10.1002/mrd.20382.
8. Alberio R. Mammalian oocyte activation: Lessons from the sperm and implications for nuclear transfer / R. Alberio, V. Zakhartchenko, J. Motlik, E. Wolf // *Int. J. Dev. Biol.* — 2001. — Vol. 45. — P. 797-809. doi: 10.1387/IJDB.11732839.
9. Whitworth K. M. Somatic Cell Nuclear Transfer efficiency: how can it be improved through nuclear remodeling and reprogramming? / K. M. Whitworth, R.S. Prather // *Mol. Reprod. Dev.* — 2010. — Vol. 77(12). — P. 1001-1015. doi: 10.1002/mrd.21242.
10. Kubiak J. Z. The metaphase II arrest in mouse oocytes is controlled through microtubule-dependent destruction of cyclin B in the presence of CSF / J. Z. Kubiak, M. Weber, H. de Pennart, N. J. Winston, B. Maro // *Embo J.* — 1993. — Vol. 12(10). — P. 3773-3778. doi: 10.1093/emboj/12.10.3773.
11. Liu L. Parthenogenetic development and protein patterns of newly matured bovine oocytes after chemical activation / L. Liu, J. C. Ju, X. Yang // *Mol. Reprod. Dev.* — 1998. — Vol. 49(3). — P. 298-307. doi: 10.1002/(SICI)1098-2795(199803)49:3<298::AID-MRD10>3.0.CO;2-T.
12. Felmer R. Activation treatment of recipient oocytes affects the subsequent development and ploidy of bovine parthenogenetic and somatic cell nuclear transfer (SCNT) embryos / R. Felmer, M. E. Arias // *Mol. Reprod. Dev.* — 2015. — Vol. 82(6). — P. 441-449. doi: 10.1002/mrd.22492.
13. Шедова Е. Влияние продолжительности воздействия циклогексимида и 6-диметил-аминопурина (6-ДМАП) на развитие клонированных эмбрионов крупного рогатого скота / Е. Шедова, А. Лопухов // *Генетика и разведение животных*. — 2020. — № 4. — С. 85-91. doi: 10.31043/2410-2733-2020-4-85-91.
14. Rosenkrans C. F. Jr. Effect of free amino acids and vitamins on cleavage and developmental rate of bovine zygotes in vitro / C. F. Jr. Rosenkrans, N. L. First // *Journal of Animal Science*. — 1994. — Vol. 72(2). — P. 434-437. doi: 10.2527/1994.722434x.
15. Wang Y. S. Effect of mSOF and G1.1/G2.2 media on the developmental competence of SCNT-derived bovine embryos / Y. S. Wang, S. Tang, Z. X. An, W. Z. Li, J. Liu, F. S. Quan, S. Hua, Y. Zhang // *Reprod. Domest. Anim.* — 2011. — Vol. 46(3). — P. 404-409. doi: 10.1111/j.1439-0531.2010.01679.x.
16. Gao H. The effect of valproic acid on bovine oocyte maturation and early embryonic development in vitro / H. Gao, H. Bai, X. Ao, R. Sa, H. Wang, Z. Wang, Y. Yue, H. Yu // *Cytotechnology*. — 2014. — Vol. 66(3). — P. 525-532. doi: 10.1007/s10616-013-9603-1.
17. Cordova A. Choosing a culture medium for SCNT and iSCNT reconstructed embryos: from domestic to wildlife species / A. Cordova, W. A. King, G. F. Mastromonaco // *J. Anim. Sci. Technol.* — 2015. — Vol. 59. — P. 24. doi: 10.1186/s40781-017-0149-1.
18. Zhang S. Aberrant DNA methylation reprogramming in bovine SCNT preimplantation embryos / S. Zhang, X. Chen, F. Wang, X. An, B. Tang, X. Zhang, L. Sun, Z. Li // *Sci. Rep.* — 2016. — Vol. 6. — P. 30345. doi: 10.1038/srep30345.
19. Akagi S. Timing of the First Cleavage and In Vitro Developmental Potential of Bovine Somatic Cell Nuclear Transfer Embryos Activated by Different Protocols / S. Akagi, S. Tamura, K. Matsukawa // *Cellular Reprogramming*. — 2019. — Vol. 22(1). <https://doi.org/10.1089/cell.2019.0074>.
20. Cuthbert J. M. Dynamics of small non-coding RNAs in bovine scNT embryos through the maternal-to-embryonic transition / J. M. Cuthbert, S. J. Russel, I. A. Polejaeva, Q. Meng, K. L. White, A. D. Benninghoff // *Biol. Reprod.* — 2021. — Vol. 105(4). — P. 918-933. doi: 10.1093/biolre/ioab107.
21. Сингина Г. Н. Развитие клонированных эмбрионов крупного рогатого скота in vitro в зависимости от параметров слияния и активации / Г. Н. Сингина, А. В. Лопухов, Е. Н. Шедова // *Сельскохозяйственная биология*. — 2020. — Т. 55. — №. 55(2). — С. 295-305. doi: 10.15389/agrobiology.2020.2.295rus.

22. Singina G. N. Production of a Cloned Offspring and CRISPR/Cas9 Genome Editing of Embryonic Fibroblasts in Cattle / G. N. Singina, P. V. Sergiev et. al. // *Dokl. Biochem. Biophys.* — 2021. — Vol. 496(1). — P. 48–51. doi: 10.1134/S1607672921010099.
23. Ferrñ L. B. Recent progress in bovine in vitro-derived embryo cryotolerance: impact of in vitro culture systems, advances in cryopreservation and future considerations / L. B. Ferrñ, M. E. Kjelland, A. M. Taiyeb, F. Campos-Chillon., P. J. Ross // *Reprod. Domest. Anim.* — 2020. — Vol. 55(6). — P. 659–676. doi: 10.1111/rda.13667.
24. Deng M. Aberrant DNA and histone methylation during zygotic genome activation in goat cloned embryos / M. A. Deng, Z. Liu, B. Chen, Y. Wan, H. Yang, Y. Zhang, Y. Cai, J. Zhou, F. Wang // *Theriogenology*. — 2020. — Vol. 148. — P. 27–36. doi: 10.1016/j.theriogenology.2020.02.036.
25. Sharma A. Effects of Dietary Fatty Acids on Bovine Oocyte Competence and Granulosa Cells / A. Sharma, V. S. Baddela, V. Roettgen, A. Vernunft, T. Viergutz, D. Dannerberger, H. M. Hammon, J. Schoen, J. Vanselow // *Front. Endocrinol.* — 2020. — Vol. 11. doi: 10.3389/fendo.2020.00087.
26. Nielsen J. M. K. New culture media affects blastocyst development and gene expression levels in in vitro-produced bovine embryos / J. M. K. Nielsen, C. Wrenzycki, P. Hyttel, F. Poppicht, L. Strmbech // *Reprod. Fertil. Dev.* — 2014. — Vol. 27(1). — P. 206–207. <https://doi.org/10.1071/RDv27n1Ab234>.
27. Wani N. In vitro maturation of pre-pubertal goat oocytes and their development after chemical activation / N. Wani, S. B. Hong // *Reprod. Fertil. Dev.* — 2019. — Vol. 31(1). P. 205. doi: 10.1071/RDv31n1Ab160.
28. Kharche S. D. Parthenogenesis and activation of mammalian oocytes for in vitro embryo production: A review / S. D. Kharche, H. S. Birade // *Advances in Bioscience and Biotechnology*. — 2013. — Vol. 4. — P. 170–182. doi:10.4236/abb.2013.4202.
29. Song B. S. Prostacyclin stimulates embryonic development via regulation of the cAMP response element-binding protein-cyclo-oxygenase-2 signalling pathway in cattle / B. S. Song, J. S. Kim, C. H. Kim, Y. M. Han, D. S. Lee, K. K. Lee, D. B. Koo // *Reprod. Fertil. Dev.* — 2009. — Vol. 21(3). — P. 400–407. doi: 10.1071/rd08180.
30. Salehi M. Comparison of Epigenetic Modifier Genes in Bovine Adipose Tissue-Derived Stem Cell Based Embryos, as Donors, with In Vitro and Parthenogenesis Embryos / M. Salehi, B. Abouhamzeh, A. Hosseini, Z. Zare, A. Bakhtari // *Cell J.* — 2020. — Vol. 22(2). — P. 149–157. doi: 10.22074/cellj.2020.6714.
31. Ailia M. J. Development of in-vitro maturation protocol for rat oocytes; under simple culture vs co-culture with cumulus cell monolayer and its developmental potential via Parthenogenetic/artificial activation / M. J. Ailia, Y. K. Jin, H. K. Kim, G. Jang // *BMC Vet. Res.* — 2021. — Vol. 17(1). — P. 44. doi: 10.1186/s12917-020-02714-8.
32. Korkmaz İ. Effect of oocyte quality and activation protocols on bovine embryo development following intracytoplasmic sperm injection / İ. Korkmaz, S. Kuplulu, Y. Agca, I. M. Polat // *Turk. J. Vet. Anim. Sc.* — 2013. — Vol. 37. — P. 26–30. doi: 10.3906/vet-1105-44.
34. Suv M. Haploid activation of bovine oocytes with ionomycin and single or combined activating agents / M. Suv, N. G. Canel, D. F. Salamone // *Reprod. Fertil. Dev.* — 2016. — Vol. 28(2). — P. 225. doi:10.1071/RDv28n2Ab188.

Lopukhov A.

Effect of post-activation culture conditions on the development of parthenogenetic embryos in cattle

Abstract.

Purpose: to conduct a comparative analysis of the effect of commercial media BO-IVC and CR1aa at the stage of the activation and subsequent culture of artificially activated oocytes on the formation and quality of parthenogenetic bovine embryos.

Materials and methods. 3 groups of disemeters of 50 goals in each were formed. In the first experimental group, the disemeter was in a meticulous manner with a ram-industrialist (artificial kriproporchid), in the second experimental-with a penEextomed ram-industrialist. In the third (control) group, a producer ram was used. In the first experimental group of a ram-industrialist (artificial kriproporchid) with attached taps were released into a group of sheep twice a day for 1.5-2 hours. In the second experimental group of a penEctomed ram, it was placed in the corral to the disemeter in the morning for 3 hours. In the third group, the lamb producer was constantly with the disemets for two weeks, then he was changed on a new ram i.e. Used the methodology used in the farm. During the experiment, they observed the behavior of animals of all groups. In the experimental groups, after the detection of disemeters in the hunt, their natural insemination of the manufacturer was carried out. Based on the results of the subsequent oster, the effectiveness of the reproduction of sheep was evaluated.

Results. The cleavage rate did not differ between the experimental groups, varying from 73,0 to 76,5%. Also, there was not found a significant effect of the conditions for post-activation culture of oocytes on their development before late morula and late blastocyst stage, which was for the CR1aa/CR1aa, CR1aa/BO-IVC and BO-IVC/BO-IVC groups $28,9 \pm 1,7$, $40,4 \pm 7,5$ and $36,0 \pm 6,4\%$, respectively. Meanwhile, we found out the effect of tested culture conditions on the ability of parthenogenetic embryos to overcome the 8-16 cell block and their quality on the late stages of embryo development. The rate of embryos with less than 16 nuclei was the highest in the CR1aa/CR1aa group ($56,8 \pm 2,1\%$). The replacement of CR1aa medium to BO-IVC medium (BO-IVC/BO-IVC group) significantly reduced this level ($p < 0,05$). The positive effect was enhanced when CR1aa medium was used at the stage of culture in the presence of 6-DMAP and cycloheximide, and subsequent embryo development was in BO-IVC medium (CR1aa/BO-IVC group) ($p < 0,001$). Furthermore, when we used the mixed variant of culture, the total cell number in parthenogenetic morula and blastocyst stage embryos increased ($p < 0,05$).

Conclusion. Thus, the BO-IVC medium at the stages of post-activation and subsequent development of artificially activated bovine oocytes is comparable to the CR1aa medium in terms of the efficiency of obtaining parthenogenetic embryos at the blastocyst stage. Nevertheless, its replacement at the post-activation stage with CR1aa medium makes it possible to improve the quality of parthenogenetic embryos.

Keywords: cattle, parthenogenetic embryos, culture conditions.

Authors:

Lopukhov A. – researcher; e-mail: vubi_myaso@mail.ru.

L. K. Ernst Federal Research Center for Animal Husbandry; Dubrovitsy, 60, Podolsk Municipal District, Moscow Region, 142132 Russia.

References

1. Wilmut I. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells / A. E. Schnieke, J. McWhir, A. J. Kind, K. H. Campbell // Nature. — 1997. — Vol. 385(6619). — P. 810-813. doi: 10.1038/385810a0.
2. Rho G.J. Activation regimens to prepare bovine oocytes for intracytoplasmic sperm injection / B. Wu, S. Kawarsky, S. P. Leibo, K. J. Betteridge // Mol. Reprod. Dev. — 1998. — Vol. 50. — P. 485–492. doi: 10.1002/(SICI)1098-2795(199808)50:4<485::AID-MRD12>3.0.CO;2-1.
3. Suv6 M. Effect of single and combined treatments with MPF or MAPK inhibitors on parthenogenetic haploid activation of bovine oocytes / N. G. Canel, D. F. Salamone // Reprod. Biol. — 2019. — Vol. 19(4). — P. 386-393. doi: 10.1016/j.repbio.2019.09.001.

4. Im G. S. Development and apoptosis of pre-implantation porcine nuclear transfer embryos activated with different combination of chemicals / J. S. Seo, I. S. Hwang, D. H. Kim, S.W. Kim, B.C. Yang, B.S. Yang, L. Lai, R.S. Prather // *Mol. Reprod. Dev.* — 2006. — Vol. 73(9). — P. 1094-1101. doi: 10.1002/mrd.20455.
5. Malin K. The many problems of somatic cell nuclear transfer in reproductive cloning of mammals / O. Witkowska-Piłaszewicz, K. Papis // *Theriogenology*. — 2022. — Vol. 189. — P. 246–254. doi: 10.1016/j.theriogenology.2022.06.030.
6. Fan H. Y. Involvement of mitogen-activated protein kinase cascade during oocyte maturation and fertilization in mammals / Q. Y. Sun // *Biol. Reprod.* — 2004. — Vol. 70(3). — P. 535-547. doi: 10.1095/biolreprod.103.022830.
7. Koo D. B. Inactivation of MPF and MAP kinase by single electrical stimulus for parthenogenetic development of porcine oocytes / J. I. Chae, J. S. Kim, G. Wee, B. S. Song, K. K. Lee, Y. M. Han // *Mol. Reprod. Dev.* — 2005. — Vol. 72(4). — P. 542-549. doi: 10.1002/mrd.20382.
8. Alberio R. Mammalian oocyte activation: Lessons from the sperm and implications for nuclear transfer / V. Zakhartchenko, J. Motlik, E. Wolf // *Int. J. Dev. Biol.* — 2001. — Vol. 45. — P. 797–809. doi: 10.1387/IJDB.11732839.
9. Whitworth K. M. Somatic Cell Nuclear Transfer efficiency: how can it be improved through nuclear remodeling and reprogramming? / R.S. Prather // *Mol. Reprod. Dev.* — 2010. — Vol. 77(12). — P. 1001-1015. doi: 10.1002/mrd.21242.
10. Kubiak J. Z. The metaphase II arrest in mouse oocytes is controlled through microtubule-dependent destruction of cyclin B in the presence of CSF / M. Weber, H. de Pennart, N. J. Winston, B. Maro // *Embo J.* — 1993. — Vol. 12(10). — P. 3773-3778. doi: 10.1002/j.1460-2075.1993.tb06055.x.
11. Liu L. Parthenogenetic development and protein patterns of newly matured bovine oocytes after chemical activation / J. C. Ju, X. Yang // *Mol. Reprod. Dev.* — 1998. — Vol. 49(3). — P. 298-307. doi: 0.1002/(SICI)1098-2795(199803)49:3<298::AID-MRD10>3.0.CO;2-T.
12. Felmer R. Activation treatment of recipient oocytes affects the subsequent development and ploidy of bovine parthenogenetic and somatic cell nuclear transfer (SCNT) embryos / M. E. Arias // *Mol. Reprod. Dev.* — 2015. — Vol. 82(6). — P. 441–449. doi: 10.1002/mrd.22492.
13. Shedova E. Effect of duration of cycloheximide and 6-dimethylaminopurine (6-DMAP) treatments on development competence of cloned embryos in cattle / A. Lopukhov // *Genetics and breeding of animals.* — 2020. — Vol. 4. — P. 85-91 (In Russ.). doi: 10.31043/2410-2733-2020-4-85-91.
14. Rosenkrans C. F. Jr. Effect of free amino acids and vitamins on cleavage and developmental rate of bovine zygotes in vitro / C. F. Jr. Rosenkrans, N. L. First // *Journal of Animal Science.* — 1994. — Vol. 72(2). — P. 434–437. doi: 10.2527/1994.722434x.
15. Wang Y. S. Effect of mSOF and G1.1/G2.2 media on the developmental competence of SCNT-derived bovine embryos / S. Tang, Z. X. An, W. Z. Li, J. Liu, F. S. Quan, S. Hua, Y. Zhang // *Reprod. Domest. Anim.* — 2011. — Vol. 46(3). — P. 404–409. doi: 10.1111/j.1439-0531.2010.01679.x.
16. Gao H. The effect of valproic acid on bovine oocyte maturation and early embryonic development in vitro / H. Bai, X. Ao, R. Sa, H. Wang, Z. Wang, Y. Yue, H. Yu // *Cytotechnology* — 2014. — Vol. 66(3). — P. 525-532. doi: 10.1007/s10616-013-9603-1.
17. Cordova A. Choosing a culture medium for SCNT and iSCNT reconstructed embryos: from domestic to wildlife species / W. A. King, G. F. Mastromonaco // *J. Anim. Sci. Technol.* — 2015. — Vol. 59. — P. 24. doi: 10.1186/s40781-017-0149-1.
18. Zhang S. Aberrant DNA methylation reprogramming in bovine SCNT preimplantation embryos / X. Chen, F. Wang, X. An, B. Tang, X. Zhang, L. Sun, Z. Li // *Sci. Rep.* — 2016. — Vol. 26(6). — P. 30345. doi: 10.1038/srep30345.
19. S. Akagi. Timing of the First Cleavage and In Vitro Developmental Potential of Bovine Somatic Cell Nuclear Transfer Embryos Activated by Different Protocols / S. Tamura, K. Matsukawa // *Cellular Reprogramming.* — 2019. — Vol. 22(1). <https://doi.org/10.1089/cell.2019.0074>.
20. Cuthbert J. M. Dynamics of small non-coding RNAs in bovine scNT embryos through the maternal-to-embryonic transition / S. J. Russel, I. A. Polejaeva, Q. Meng, K. L. White, A. D. Benninghoff // *Biol. Reprod.* — 2021. — Vol. 105(4). — P. 918-933. doi: 10.1093/biolre/iaob107.

21. Singina G. N. In vitro development of cloned embryo in cattle in relation with fusion and activation parameters / A. V. Lopukhov, E. N. Shedova // *Agricultural Biology* — 2020. — Vol. 55(2). — P. 295–305 (In Russ.). doi: 10.15389/agrobiology.2020.2.295eng.
22. Singina G. N. Production of a Cloned Offspring and CRISPR/Cas9 Genome Editing of Embryonic Fibroblasts in Cattle / P. V. Sergiev, A. V. Lopukhov, M. P. Rubtsova, N. P. Taradajnic, N. V. Ravine, E. N. Shedova, T. E. Taradajnic, I. A. Polejaeva, A. V. Dozev, G. Brem, O. A. Dontsova, N. A. Zinovieva // *Dokl. Biochem. Biophys.* — 2021. — Vol. 496(1). — P. 48–51. doi: 10.1134/S1607672921010099.
23. Ferř L.B. Recent progress in bovine in vitro-derived embryo cryotolerance: impact of in vitro culture systems, advances in cryopreservation and future considerations / M. E. Kjelland, A. M. Taiyeb, F. Campos-Chillon., P. J. Ross // *Reprod. Domest. Anim.* — 2020. — Vol. 55(6). — P. 659–676. doi: 10.1111/rda.13667.
24. Deng M. Aberrant DNA and histone methylation during zygotic genome activation in goat cloned embryos / Z. Liu, B. Chen, Y. Wan, H. Yang, Y. Zhang, Y. Cai, J. Zhou, F. Wang // *Theriogenology*. — 2020. — Vol. 148. — P. 27–36. doi: 10.1016/j.theriogenology.2020.02.036.
25. Sharma A. Effects of Dietary Fatty Acids on Bovine Oocyte Competence and Granulosa Cells / V. S. Baddela, V. Roettgen, A. Vernunft, T. Viergutz, D. Dannerberger, H. M. Hammon, J. Schoen, J. Vanselow // *Front. Endocrinol.* — 2020. — Vol. 11. doi: 10.3389/fendo.2020.00087.
26. Nielsen J. M. K. New culture media affects blastocyst development and gene expression levels in in vitro-produced bovine embryos / C. Wrenzycki, P. Hyttel, F. Poppicht, L. Strübech // *Reprod. Fertil. Dev.* — 2014. — Vol. 27(1). — P. 206–207. <https://doi.org/10.1071/RDv27n1Ab234>.
27. Wani N. In vitro maturation of pre-pubertal goat oocytes and their development after chemical activation / S. B. Hong // *Reprod. Fertil. Dev.* — 2019. — Vol. 31(1). P. 205. doi: 10.1071/RDv31n1Ab160.
28. Kharche S. D. Parthenogenesis and activation of mammalian oocytes for in vitro embryo production: A review / H. S. Birade // *Advances in Bioscience and Biotechnology*. — 2013. — Vol. 4. — P. 170–182. doi:10.4236/abb.2013.4202.
29. Song B. S. Prostacyclin stimulates embryonic development via regulation of the cAMP response element-binding protein-cyclo-oxygenase-2 signalling pathway in cattle / J. S. Kim, C. H. Kim, Y. M. Han, D. S. Lee, K. K. Lee, D. B. Koo // *Reprod. Fertil. Dev.* — 2009. — Vol. 21(3). — P. 400–407. doi: 10.1071/rd08180.
30. Salehi M. Comparison of Epigenetic Modifier Genes in Bovine Adipose Tissue-Derived Stem Cell Based Embryos, as Donors, with In Vitro and Parthenogenesis Embryos / B. Abouhamzeh, A. Hosseini, Z. Zare, A. Bakhtari // *Cell J.* — 2020. — Vol. 22(2). — P. 149–157. doi: 10.22074/cellj.2020.6714.
31. Korkmaz İ. Effect of oocyte quality and activation protocols on bovine embryo development following intracytoplasmic sperm injection / İ. Korkmaz, S. Kuplulu, Y. Agca, I. M. Polat // *Turk. J. Vet. Anim. Sc.* — 2013. — Vol. 37. — P. 26–30. doi: 10.3906/vet-1105-44.
32. Ailia M. J. Development of in-vitro maturation protocol for rat oocytes; under simple culture vs co-culture with cumulus cell monolayer and its developmental potential via Parthenogenetic/artificial activation / M. J. Ailia, Y. K. Jin, H. K. Kim, G. Jang // *BMC Vet. Res.* — 2021. — Vol. 17(1). — P. 44. doi: 10.1186/s12917-020-02714-8.
33. Suv M. Haploid activation of bovine oocytes with ionomycin and single or combined activating agents / M. Suv, N. G. Canel, D. F. Salamone // *Reprod. Fertil. Dev.* — 2016. — Vol. 28(2). — P. 225. doi:10.1071/RDv28n2Ab188.