

УДК 591

ПОЛУЧЕНИЕ ДВУХКЛЕТОЧНЫХ РЕКОНСТРУИРОВАННЫХ ЭМБРИОНОВ КРЫСЫ ПОСЛЕ ХИМИЧЕСКОЙ ИНАКТИВАЦИИ ЭТОПОЗИДОМ ХРОМОСОМ ООЦИТОВ НА СТАДИИ МЕТАФАЗЫ II¹

© 2008 г. Ю. А. Зайцева***, М. Бадер*, А. С. Кривохарченко*

*Центр молекулярной медицины им. Макса Дельбрюка
13125 Германия, Берлин, ул. Роберт-Рессель, д.10

** Институт цитологии РАН
194064 Санкт-Петербург, Тухорецкий пр., д. 4

E-mail: zaitsewa@hotmail.com

Поступила в редакцию 11.02.08 г.
Окончательный вариант получен 14.04.08 г.

Исследована возможность применения этопозиды для химической энуклеации ооцитов крыс. Проведен сравнительный анализ эффективности реконструирования после химической и механической энуклеации. Полученные результаты свидетельствуют о практически одинаковой жизнеспособности реконструированных эмбрионов крыс, независимо от метода энуклеации.

Ключевые слова: энуклеация, этопозид, развитие *in vitro*, реконструированный эмбрион крысы.

Одним из важных этапов клонирования является энуклеация – удаление генетического материала ооцита. В настоящее время для энуклеации ооцитов млекопитающих существуют два различных подхода: механический и химический. Механический способ заключается в извлечении хромосом при помощи микропипетки. Этот метод связан с высокой степенью травматичности, что снижает эффективность манипуляции, кроме того, он весьма трудоемок и требует большого опыта оператора.

На данный момент для химической энуклеации используются такие вещества, как этопозид – ингибитор фермента топоизомеразы II, который необходим для разделения, конденсации и деконденсации хромосом во время митоза, циклогексимид – блокатор синтеза белка в цитоплазме, а также дестабилизаторы микротрубочек демеколцин и нокодазол. В результате применения химических веществ генетический материал либо остается в ооците-реципиенте, не вовлекаясь в последующее развитие реконструированного эмбриона (этопозид), либо выделяется вместе с полярным тельцем (демеколцин, нокодазол, этопозид в комбинации с циклогексимидом).

Этопозид в сочетании с циклогексимидом был впервые использован для химической энуклеации

ооцитов мыши на стадии метафазы I (Fulka et al., 1993). В результате генетический материал выделялся вместе с полярным тельцем и энуклеированными оказались 96% ооцитов. Японские ученые (Elsheikh et al., 1997), применяя сходный протокол для подготовки цитопласта, проследили развитие реконструированного эмбриона мыши до 4-клеточной стадии. Та же группа, используя ооциты мыши на стадии метафазы II и этопозид без добавления циклогексимиды, наблюдала развитие реконструированного эмбриона до стадии blastocysts, хотя и с низкой степенью эффективности (4%) (Elsheikh et al., 1998). В качестве кариопластов в обоих случаях реконструирования использовали blastomeres 2-клеточных эмбрионов мыши.

При использовании для энуклеации ооцитов мыши демеколцина (Gasparini et al., 2003) эффективность процедуры составила чуть более 30%. Было показано, что цитопласт, полученный в результате химической энуклеации демеколцином, способен поддерживать развитие ядра эмбриональной стволовой клетки, хоть и с меньшей эффективностью, чем цитопласт, полученный в результате механической энуклеации.

На сегодняшний день исследования по применению химической энуклеации проводились не только на мышках, но и на свиньях, коровах, кроликах.

Так, в работе по реконструированию ооцитов свиньи при использовании демеколцина для хими-

¹ Работа поддержана Европейским Союзом (проект EURA-TOOLS, LSHGCT-2005-019015) и Программой "Berlin Program to Support Equal Opportunities for Females in Research and Teaching".

ческой энуклеации ооцитов (эффективность около 90%) получены клонированные животные (Yin et al., 2002b). Попытка химической энуклеации ооцитов свиньи при помощи этопозиды в сочетании с циклогексимидом на стадии метафазы I была предпринята канадскими учеными (Savard et al., 2004), однако эффективность энуклеации оказалась достаточно низкой, около 40%. При энуклеации ооцитов овцы демеколцином на стадии метафазы I количество энуклеированных ооцитов составило 58% (Hou et al., 2006). В работе японских ученых (Yin et al., 2002a) сообщалось об имплантации клонированных эмбрионов кролика, энуклеация ооцитов которых также производилась демеколцином на стадии метафазы I. Химическая энуклеация при помощи демеколцина оказалась эффективна и для подготовки цитопласта в работе по соматическому клонированию коровы, процент энуклеированных ооцитов при этом составил около 90, а клонированных бластоцист – 19 (Russell et al., 2005). Из вышеперечисленных фактов видно, что эффективность химической энуклеации, а также развитие реконструированных эмбрионов существенно варьируют от вида к виду. Видовые особенности требуют оптимизации протокола химической энуклеации для каждого конкретного случая.

Особенностью ооцитов крыс является то, что первое полярное тельце наблюдается лишь у 1% овулировавших ооцитов (Iannaccone et al., 2001). Это делает невозможным использовать его в качестве маркера местоположения метафазной пластинки II при механической энуклеации, что затрудняет энуклеацию больших групп ооцитов. Химический способ привлекателен возможностью существенно упростить и ускорить процедуру энуклеации. На данный момент какая-либо информация о химической энуклеации ооцитов крыс в литературе отсутствует.

Цель работы – изучение возможности применения этопозиды для химической энуклеации ооцитов крыс на стадии метафазы II, а также сравнение способности к развитию реконструированных эмбрионов после механической и химической энуклеации.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Ооциты получали от суперовулировавших самок крыс линии SD в возрасте 21–28 сут. Для вызывания суперовуляции животным внутривенно вводили 15 МЕ гонадотропина сыворотки жеребой кобылы, а через 45–50 ч 30 МЕ хорионического гонадотропина человека (ХГЧ; препараты фирмы “Intervet”, Германия; далее использовали препараты фирмы “Sigma”, США). Через 20–23 ч после инъекции ХГЧ ооциты извлекали из яйцеводов и помещали на 5 мин в среду M16, содержащую 0.1% гиалуронидазы, для освобождения от кумулюсных клеток.

Для химической энуклеации в качестве блокатора генетического материала был использован этопозид в концентрации 50 мкг на 1 мл в среде M16. Для растворения этопозиды использовали диметилсульфоксид (ДМСО). Ооциты находились в растворе этопозиды 1.5, 2.5, 4 или 6 ч, затем их отмывали в течение 5 мин в 1 М растворе сахарозы. Контролем служили ооциты, инкубированные в среде M16 с ДМСО. При механической энуклеации удаление генетического материала ооцита (область грушевидного выпячивания) осуществляли с помощью микропипетки в среде M2, содержащей 5 мкг/мл цитохалазина Б. При этом метафазную пластинку удаляли вместе с частью цитоплазмы. Контролем качества энуклеации служило окрашивание оопластов красителем Хехст 33342 и кратковременное, в течение 5 с, ультрафиолетовое облучение, что позволило отбраковывать неэнуклеированные ооциты. В качестве донора генетической информации использовали кумулюсную клетку, вводимую под *zona pellucida* энуклеированного ооцита. Для слияния цитоплазматических мембран кумулюсной клетки и ооцита использовали электроимпульс (Krivokharchenko et al., 2002). С этой целью реконструированные ооциты предварительно помещали в среду для слияния, состоящую из 0.3 М манитола, 0.1 мМ $MgCl_2$ и 0.1 мМ $CaCl_2$, на 1–2 мин, а затем переносили в камеру для слияния в ту же среду между электродами. На первом этапе при помощи импульсного генератора GI-2 (Пушино, Россия) использовали переменное электрическое поле (8 В, 500 кГц, 10 с), на втором – два электроимпульса (60 В, 20 мс) с паузой между ними в 100 мс.

Для партеногенетической активации ооциты культивировали в инкубаторе в среде M16 без ионов Ca^{2+} и Mg^{2+} , содержащей 2 мМ Sr^{2+} , в течение 20 мин при температуре 37°C и атмосфере с 5% углекислого газа (Krivokharchenko et al., 2003). Эффективность активации оценивали через 10–12 ч. Для этого ооциты исследовали с помощью инвертированного микроскопа с оптикой Номарского (“Leika”, Германия). Активированными считали ооциты с видимыми пронуклеусами. Через 24 ч оценивали способность ооцитов к дальнейшему развитию в среде mR1ECM (Miyoshi et al., 1997).

Полученные результаты обрабатывали статистически с использованием *t*-критерия Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТЫ

В первой серии опытов изучали влияние этопозиды на партеногенетическую активацию ооцитов крыс и на последующее развитие полученных партеногенетических эмбрионов. Как видно из табл. 1, этопозид практически не влиял на способность ооцитов к партеногенетической активации. Независимо от продолжительности инкубации около 90% ооцитов сформировали пронуклеусы, различия между группами не достоверны. В то же

Таблица 1. Влияние этопозиды на партеногенетическую активацию и развитие ооцитов крыс

Время воздействия, ч	Число		Активированные ооциты, %*	Эмбрионы, достигшие 2-клеточной стадии, %**
	крыс	ооцитов		
1.5	4	148	88.5 (131/148)	19.8 (26/131)
2.5	3	134	89.6 (120/134)	9.2 (11/120)
4	6	163	87.7 (143/163)	4.2 (6/143)
6	6	172	93.0 (160/172)	6.9 (11/160)
Контроль (ДМСО), 6	6	178	93.8 (167/178)	83.8 (140/167)

Примечание. В скобках указано: *отношение числа ооцитов, переживших активацию, к общему числу ооцитов в группе; **отношение числа эмбрионов к числу ооцитов, переживших активацию.

время при увеличении продолжительности воздействия этопозиды с 1.5 до 6 ч количество 2-клеточных партеногенетических эмбрионов составило: при воздействии 1.5 ч – 19.8 (26/131), 2.5 ч – 9.2 (11/120), 4 ч – 4.2 (6/143) и 6 ч – 6.9% (11/160). В контрольной же группе 83.8% (140/167) активированных ооцитов развились до этой стадии, различия по сравнению с опытными группами достоверны ($p < 0.05$). Таким образом, культивирование ооцитов крысы в среде, содержащей этопозид, не оказывало влияния на их способность к активации стронцием. В то же время этопозид практически полностью блокировал дальнейшее развитие активированных ооцитов.

Во второй серии опытов оценивали возможность применения этопозиды для энуклеации ооцитов крысы при реконструировании. Как видно из табл. 2, динамика изменения количества выживших эмбрионов от этапа к этапу реконструирования с использованием механической энуклеации сходна с таковой при химической энуклеации. Так, процент выживших эмбрионов после механической энуклеации и инъекции кумулюсной клетки составил 54.9, а после воздействия этопозиды в течение 4 ч

и инъекции кумулюсной клетки – 68.2, различие недостоверно. При реконструировании с использованием как механической, так и химической энуклеации количество выживших реконструированных эмбрионов после воздействия электроимпульсом и стронцием в течение 30 мин достоверно не различается, составляя соответственно 45.1 и 49.4%. При этом у эмбрионов, полученных в результате реконструирования с помощью механической энуклеации, формировался один видимый пронуклеус, в то время как у реконструированных с помощью химической энуклеации формировались два видимых пронуклеуса: один из пересаженного ядра, а другой – из хроматина яйцеклетки. Способность реконструированных эмбрионов к дроблению была также одинакова при обоих способах энуклеации: 16.2% после механической энуклеации и 16.5% – после энуклеации этопозидом.

ОБСУЖДЕНИЕ

Практически во всех известных на сегодняшний день исследованиях по химической энуклеации хромосомный набор клетки выделялся в виде полярного тельца (Elsheikh et al., 1997; Gasparrini et al., 2003; Ibanez et al., 2003; Savard et al., 2004). Вместе с тем показано, что выделение полярного тельца, а вместе с ним и всего генетического материала может быть временным событием, без воздействия химическим агентом хромосомный набор способен вернуться обратно в цитопласт (Fulka et al., 2004; Gasparrini et al., 2003).

Мы полагаем, что главным критерием успешной энуклеации является вовлечение генетического материала реципиентной клетки в дальнейшее развитие.

Как известно, для успешного реконструирования важен не только факт энуклеации ооцита, но и способность цитопласта поддерживать развитие внесенного генетического материала. В результате клонирования мыши с использованием этопозиды для энуклеации ооцита без удаления генетического материала и бластомеров поздней

Таблица 2. Выживаемость эмбрионов крыс на разных этапах реконструирования при использовании химической или механической энуклеации

Реконструирование с помощью энуклеации	Число ооцитов крыс	Выжившие, %			Одноклеточные эмбрионы с видимыми пронуклеусами, %	2-Клеточные эмбрионы, %
		эмбрионы после энуклеации и инъекции кумулюсной клетки	ооциты после воздействия электроимпульсом	ооциты после воздействия стронцием		
Механической	142	54.9 ^a (78/142)	45.1 ^a (64/142)	45.1 ^a (64/142)	28.2 ^a (40/142)	16.2 ^a (23/142)
Химической	85	68.2 ^b (58/85)	49.4 ^b (42/85)	49.4 ^b (42/85)	43.5 ^b (37/85)	16.5 ^b (14/85)

Примечания. ^{a b} Различия значений в пределах столбцов недостоверны; в скобках – отношение числа выживших эмбрионов или ооцитов к общему числу ооцитов.

2-клеточной стадии в качестве кариопластов были получены бластоцисты с эффективностью 4% (Elsheikh et al., 1998). Однако в этой работе отсутствует информация о воздействии этопозиды на партеногенетическую активацию ооцитов мыши.

В наших экспериментах изучали возможность применения этопозиды для энуклеации ооцитов крыс, находящихся на стадии метафазы II. Инкубация ооцитов крыс в течение 4 ч в среде, содержащей этопозид, не оказывала влияния на партеногенетическую активацию ооцитов и формирование видимых пронуклеусов, но вместе с тем вызывала надежную блокировку генетического материала. Доказательством того, что генетический материал энуклеированной таким образом яйцеклетки не способен обеспечивать дальнейшее развитие эмбриона, является крайне низкий процент 2-клеточных партеногенетических эмбрионов после воздействия этопозиды (4.2), в то время как в контрольной группе эта величина составляет 83.8. Увеличение продолжительности воздействия этопозидом не привело к повышению эффективности энуклеации. В данном случае можно говорить о функциональной энуклеации, так как генетический материал, оставаясь в ооците и сохраняя способность к формированию пронуклеуса, теряет способность обеспечивать дальнейшее развитие.

Наша работа посвящена получению реконструированных эмбрионов крысы после химической энуклеации яйцеклеток. Выживаемость эмбрионов крыс от этапа к этапу реконструирования как при использовании химической энуклеации (этопозид), так и при механической энуклеации представляет собой схожую картину. Не было выявлено достоверной разницы в проценте выживших после энуклеации и инъекции кумулюсной клетки эмбрионов, полученных с использованием химической или механической энуклеации. После воздействия электроимпульсом выживаемость эмбрионов при реконструировании с использованием этопозиды была такой же, как при реконструировании с использованием механической энуклеации. Жизнеспособность эмбрионов оставалась неизменной после воздействия стронцием при обоих способах реконструирования. Доля 2-клеточных реконструированных эмбрионов крысы практически равна как при химической, так и при механической энуклеации и составляет около 16%. При этом реконструированных эмбрионов, достигших 2-клеточной стадии после химической энуклеации и пересадки ядра кумулюсной клетки, было достоверно больше (16.5%), чем эмбрионов, которым не пересаживали донорский геном (4.2%). Это подтверждает наш вывод о функциональной неактивности генома энуклеированной этопозидом яйцеклетки.

К сожалению, дальнейшая оценка выживаемости реконструированных эмбрионов крысы *in vitro* невозможна, поскольку развитие останавливается на 2-клеточной стадии вне зависимости от применяемой методики реконструирования (Jiang et al., 2002; Hirabayashi et al., 2003; Popova et al., 2006; Tomioka et al., 2007; Yoo et al., 2007). Подобной особенности не наблюдается у реконструированных эмбрионов других видов млекопитающих.

Факт развития реконструированных 2-клеточных эмбрионов крысы говорит о принципиальной возможности применения этопозиды для химической энуклеации ооцитов при пересадке ядер. Этот способ энуклеации позволяет обрабатывать одновременно большие группы ооцитов, является менее трудоемким и травматичным в сравнении с традиционным механическим. Вместе с тем необходимы дальнейшие исследования по изучению жизнеспособности реконструированных таким образом эмбрионов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Elsheikh A.S., Takahashi Y., Hishinuma M. et al. Developmental ability of mouse late 2-cell stage blastomeres fused to chemically enucleated oocytes *in vitro* // J. Vet. Med. Sci. 1997. V. 59. P. 107–113.
- Elsheikh A.S., Takahashi Y., Katagiri S. et al. Functional enucleation of mouse metaphase II oocytes with etoposide // Jpn. J. Vet. Res. 1998. V. 45. P. 217–220.
- Fulka J., Jr., Notarianni E., Passoni L. et al. Early changes in embryonic nuclei fused to chemically enucleated mouse oocytes // Int. J. Devel. Biol. 1993. V. 37. P. 433–439.
- Fulka H., Mrazek M., Tepla O. et al. DNA methylation pattern in human zygotes and developing embryos // Reproduction. 2004. V. 128. P. 703–708.
- Gasparrini B., Gao S., Ainslie A. et al. Cloned mice derived from embryonic stem cell karyoplasts and activated cytoplasts prepared by induced enucleation // Biol. Reprod. 2003. V. 68. P. 1259–1266.
- Hirabayashi M., Kato M., Takeuchi A. et al. Factors affecting premature chromosome condensation of cumulus cell nuclei injected into rat oocytes // J. Reprod. Devel. 2003. V. 49. P. 121–126.
- Hou J., Lei T., Liu L. et al. Demecolcine-induced enucleation of sheep meiotically maturing oocytes // Reprod. Nutr. Devel. 2006. V. 46. P. 219–226.
- Iannaccone P., Taborn G., Garton R. Preimplantation and postimplantation development of rat embryos cloned with cumulus cells and fibroblasts // Zygote. 2001. V. 9. P. 135–143.
- Ibanez E., Albertini D.F., Overstrom E.W. Demecolcine-induced oocyte enucleation for somatic cell cloning: coordination between cell-cycle egress, kinetics of cortical cytoskeletal interactions, and second polar body extrusion // Biol. Reprod. 2003. V. 68. P. 1249–1258.
- Jiang J.Y., Mizuno S., Mizutani E. et al. Parthenogenetic activation and subsequent development of rat oocytes *in vitro* // Mol. Reprod. Devel. 2002. V. 61. P. 120–125.

- Krivokharchenko A., Galat V., Ganten D. et al. In vitro formation of tetraploid rat blastocysts after fusion of two-cell embryos // *Ibid.* 2002. V. 61. P. 460–465.
- Krivokharchenko A., Popova E., Zaitseva I. et al. Development of parthenogenetic rat embryos // *Biol. Reprod.* 2003. V. 68. P. 829–836.
- Miyoshi K., Kono T., Niwa K. Stage-dependent development of rat 1-cell embryos in a chemically defined medium after fertilization *in vivo* and *in vitro* // *Ibid.* 1997. V. 56. P. 180–185.
- Popova E., Bader M., Krivokharchenko A. Full-term development of rat after transfer of nuclei from two-cell stage embryos // *Ibid.* 2006. V. 75. P. 524–530.
- Russell D.F., Ibanez E., Albertini D.F. et al. Activated bovine cytoplasts prepared by demecolcine-induced enucleation support development of nuclear transfer embryos *in vitro* // *Mol. Reprod. Devel.* 2005. V. 72. P. 161–170.
- Savard C., Novak S., Saint-Cyr A. et al. Comparison of bulk enucleation methods for porcine oocytes // *Ibid.* 2004. V. 67. P. 70–76.
- Tomioka I., Mizutani E., Yoshida T. et al. Spindle formation and microtubule organization during first division in reconstructed rat embryos produced by somatic cell nuclear transfer // *J. Reprod. Devel.* 2007. V. 53. P. 835–842.
- Yin X.J., Kato Y., Tsunoda Y. Effect of enucleation procedures and maturation conditions on the development of nuclear-transferred rabbit oocytes receiving male fibroblast cells // *Reproduction.* 2002a. V. 124. P. 41–47.
- Yin X.J., Tani T., Yonemura I. et al. Production of cloned pigs from adult somatic cells by chemically assisted removal of maternal chromosomes // *Biol. Reprod.* 2002b. V. 67. P. 442–446.
- Yoo J.G., Demers S.P., Lian L. et al. Developmental arrest and cytoskeletal anomalies of rat embryos reconstructed by somatic cell nuclear transfer // *Cloning Stem Cells.* 2007. V. 9. P. 382–393.

Production of Reconstructed Two-Cell Rat Embryos after Chemical Inactivation of Chromosomes in MII Oocytes by Etoposide

Yu. A. Zaitseva^{a,b}, M. Bader^a, and A. S. Krivokharchenko^a

^a Max-Delbruck Center for Molecular Medicine, Robert-Rossle-Str. 10, Berlin, 13125 Germany

^b Institute of Cytology, Russian Academy of Sciences, Tikhoretskii prosp. 4, St. Petersburg, 194064 Russia
e-mail: zaitsewa@hotmail.com

Abstract—The application of etoposide for chemical enucleation of rat oocytes was tested. The reconstruction efficiency after chemical and mechanical enucleation was comparatively analyzed. The obtained data indicate similar viability of reconstructed rat embryos irrespective of the enucleation technique.

Key words: enucleation, etoposide, *in vitro* development, reconstructed rat embryo.