

## ОБОЛОЧКИ ПРЕИМПЛАНТАЦИОННЫХ ЗАРОДЫШЕЙ МЛЕКОПИТАЮЩИХ КАК МИШЕНЬ РЕПРОДУКТИВНЫХ ТЕХНОЛОГИЙ

© 2012 г. И. Н. Рожкова<sup>1</sup>, Е. Ю. Брусенцев<sup>1</sup>, С. Я. Амстиславский<sup>1, 2</sup>

<sup>1</sup> Институт цитологии и генетики СО РАН  
630090 Новосибирск, проспект Лаврентьева, д. 10

<sup>2</sup> Новосибирский государственный университет  
630090 Новосибирск, ул. Пирогова, д. 2

E-mail: amstis@bionet.nsc.ru

Поступила в редакцию 28.09.11 г.

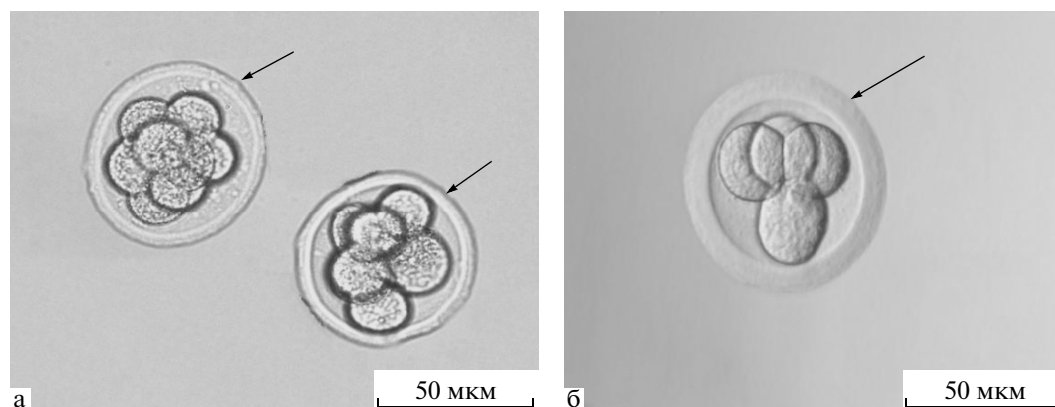
Окончательный вариант получен 16.11.11 г.

В обзоре описано строение и функция оболочек ооцитов и доимплантационных зародышей млекопитающих. Для успешного проведения замораживания эмбрионов и, особенно, редеривации необходима целостность оболочек зародыша. В то же время в некоторых случаях при проведении ЭКО или при замораживании эмбрионов некоторых видов млекопитающих результаты могут улучшаться, если оболочки перфорируют, нарушая их целостность. Рассмотрены современные репродуктивные технологии, такие как замораживание эмбрионов, экстракорпоральное оплодотворение, ICSI, искусственный хэтчинг, иммуноконтрацепция и редеривация, и роль оболочек ооцитов и ранних зародышей в контексте этих технологий. Рассмотрены особенности проведения этих технологий у разных видов млекопитающих с акцентом на роль оболочек в этом процессе.

*Ключевые слова:* оболочки эмбрионов, криоконсервация эмбрионов, ЭКО, искусственный хэтчинг, иммуноконтрацепция, редеривация.

В последнее время оболочкам яйцеклеток (ооцитов) и доимплантационных зародышей уделяют большое внимание (Denker, 2000; Menkhorst, Selwood, 2008; Van Soom et al., 2010). Одной из основных оболочек, которая характерна для всех преимплантационных эмбрионов млекопитающих, является *zona pellucida*, или, как ее называют в русскоязычной литературе, прозрачная оболочка (Амстиславский и др., 1991; Rankin et al., 2000; Denker, 2000; Menkhorst, Selwood, 2008). Эта структура формируется у млекопитающих ооцитом и окружающими его фолликулярными клетками, являясь впоследствии, после овуляции и оплодотворения ооцита, естественным барьером между эмбрионом и окружающей средой; эта основная оболочка играет важнейшую роль в оплодотворении яйцеклетки (ооцита) и последующем развитии эмбриона и сохраняется у большинства видов млекопитающих до стадии поздней бластоцисты (Denker, 2000; Bedford, 2004; Van Soom et al., 2010). Именно благодаря наличию *zona pellucida* размер эмбриона на преимплантационных стадиях развития меняется у большинства млекопитающих незначительно (Senger, 2003). Исключение составляют предста-

вители семейства хищных (Amstislavsky, 2009), а также кролики (Böving, 1957) и лошади (Betteridge, 1989). Однако у кролика и лошади, а также некоторых других животных наряду с прозрачной оболочкой (или вместо нее) на определенной стадии преимплантационного развития появляются дополнительные оболочки (Böving, 1957; Betteridge, 1989; Denker, 2000; Menkhorst, Selwood, 2008), состав и свойства которых существенно отличаются от *zona pellucida*. Успех многих современных репродуктивных технологий зависит от свойств оболочек преимплантационных эмбрионов (Montag et al., 2000; Papanikolaou et al., 2008; Kawase et al., 2009; Van Soom et al., 2009; Sills, Palermo, 2010; Van Soom et al., 2010). В данном обзоре наибольшее внимание уделено роли оболочек эмбриона в процессах иммуноконтрацепции, редеривации, замораживания и криоконсервации, экстракорпорального оплодотворения и некоторых других эмбриотехнологических методах. Наибольшее внимание уделено млекопитающим, хотя в ряде случаев приведены результаты работ, полученные на сумчатых.



**Рис. 1.** Дробящийся эмбрион мыши (а) и хомячка Кэмпбэлла (б) на 3-й день развития. Стрелкой указана прозрачная оболочка. Эмбрионы были заморожены на программном замораживателе CL8800 (CryoLogic) и после хранения при температуре жидкого азота были разморожены при 38 градусах Цельсия и сфотографированы на инвертированном микроскопе Leica Microsystems DM IL LED.

### СТРОЕНИЕ И СВОЙСТВА *ZONA PELLUCIDA* И ДРУГИХ ОБОЛОЧЕК ПРЕИМПЛАНТАЦИОННЫХ ЭМБРИОНОВ МЛЕКОПИТАЮЩИХ

Прозрачная оболочка млекопитающих эластична (Schwartz et al., 1996), снабжена порами (Dudkiewicz, Williams, 1977) и является достаточно прочной барьерной структурой, ограждающей яйцеклетки и эмбрионы от механических и биологических факторов, в частности, от вирусов (Van Soom et al., 2010). Физические свойства *zona pellucida*, такие как характер пористости, прочность, толщина, проницаемость для воды и других неорганических компонентов и другие характеристики, изменяются в зависимости от ряда факторов: вида животного, стадии развития зародыша, а также зависят от того, получен ли эмбрион *in vivo* или *in vitro* (Van Zoom et al., 2010). Толщина прозрачной оболочки и характеристики проницаемости различны у разных видов млекопитающих. Например, у мышей она тонкая (5 мкм), а у свиней толстая и прочная (16 мкм) (Bedford, 2004). Даже в пределах одного таксона могут быть существенные видовые различия характеристик *zona pellucida*. Так, например, у двух видов грызунов — мыши (*Mus musculus*) и хомячков Кэмпбэлла (*Phodopus campbelli*), по нашим наблюдениям, имеются весьма существенные различия в толщине прозрачной оболочки (рис. 1)

Исследования проницаемости *zona pellucida* ооцитов и зигот мыши показали, что вещества с низкой молекулярной массой могут свободно проходить через прозрачную оболочку (Legge, 1995). Нужно, однако, принять во внимание тот факт, что проницаемость прозрачной оболочки для молекул зависит не только от их размера, но также и от других биохимических или физико-химических факторов, таких как их гидрофиль-

ные/липофильные свойства. Так, например, липиды относительно легко проникают через прозрачную оболочку мыши (Turner, Horobin, 1997).

По химическому составу *zona pellucida* состоит из гликопротеидов — соединений белков с углеводами и представляет собой внеклеточный гликокаликс. В образовании прозрачной оболочки ооцитов и эмбрионов млекопитающих принимают участие четыре гликопротеида: ZP1, ZP2, ZP3 и ZP4, хотя не все виды животных имеют в *zona pellucida* этот набор целиком. Некоторые авторы используют другие обозначения для этих гликопротеидов: ZPA, ZPB, ZPC (Martinez, Harris, 2000; Delves et al., 2002b; Naz et al., 2005; Eade et al., 2009). Как было показано на лабораторной мыши, молекулы гликопротеидов ZP2 и ZP3 соединяются друг с другом попеременно и образуют цепочки, соединенные друг с другом через “мостики” (состоящие из молекул ZP1), в результате чего образуется структура, похожая на сеть (Wassarman, 1988). ZP2 и ZP3 играют большую роль в процессах оплодотворения, причем у мышей и большинства других видов млекопитающих ZP3 выступает в роли рецептора при взаимодействии сперматозоида и яйцеклетки (Vazquez et al., 1989; Hinsch et al., 1994). Углеводные части этого гликопротеида выступают в качестве видоспецифичных лигандов для связывания со сперматозоидами и у разных видов различаются по химическому составу (Moller et al., 1990; Nagdas et al., 1994).

У мышей прозрачная оболочка состоит лишь из трех гликопротеидов: ZP1, ZP2, ZP3 (Wassarman, 1988; Rankin et al., 2000). В исследованиях на нокаутных линиях мышей, у которых был произведен избирательный нокаут соответствующих генов и один из этих гликопротеидов не экспрессировался, была выявлена роль каждого из них в процессе оплодотворения яйцеклетки и в развитии зародыша. Было установлено, что важней-

шую роль в процессе оплодотворения яйцеклеток мышей играет гликопротеид ZP3 (Liu et al., 1996; Rankin et al., 2000).

Поскольку у млекопитающих оплодотворение моноспермное, то для того чтобы эмбрион развивался нормально, в яйцеклетку должно попасть не более одного сперматозоида (Soupart, Strong, 1975). После проникновения сперматозоида структура *zona pellucida* меняется, и эти изменения являются частью сложного механизма, осуществляющего блок полиспермии и препятствующего проникновению более одного сперматозоида в яйцеклетку (Soupart, Strong, 1975). Данный механизм заключается в общем случае в том, что в результате высвобождения содержимого кортикальных гранул от гликопротеидов (ZP2 и ZP3) отщепляются углеводные остатки, что препятствует взаимодействию других сперматозоидов с измененной прозрачной оболочкой (Soupart, Strong, 1975).

Прозрачная оболочка удерживает клетки эмбриона вместе в заданном ею объеме (Van Zoom et al., 2010), и целостность ее является важным фактором на определенных этапах развития зародыша *in vivo* (Bronson and McLaren, 1970). По мере развития преимплантационных зародышей и движения их по яйцеводу и матке *zona pellucida* у эмбрионов большинства млекопитающих в большей или меньшей мере модифицируется по структуре и химическому составу. У многих видов млекопитающих, например, по мере продвижения дробящихся зародышей по яйцеводу на прозрачной оболочке аккумулируется протеин, который образуется в яйцеводах под действием эстрогенов (Murray, Messinger, 1994; Hill et al., 1996; Vuhli et al., 2000). При попадании эмбрионов в матку на *zona pellucida* адсорбируются белковые соединения (мукопротеиды), выделяемые маточными железами, при этом структура и характеристики прозрачной оболочки у многих, если не всех, млекопитающих изменяются (Denker, 2000). У некоторых видов млекопитающих по мере движения по репродуктивным путям появляются дополнительные оболочки, которые существуют наряду с *zona pellucida*, либо заменяют ее (Betteridge, 1989; Denker, 2000; Menkhorst, Selwood, 2008). Особенно хорошо они изучены у кролика и лошади (Böving, 1957; Betteridge, 1989; Denker, 2000). У кролика прозрачная оболочка постепенно замещается на сложную структуру, состоящую из нескольких слоев: неозона, мукопротеидный слой и глоиолемма (Böving, 1957; Denker, 2000). Этот процесс происходит постепенно и начинается на стадии ранней бластоцисты при переходе эмбриона в матку. Сначала на внешней поверхности *zona pellucida* образуется мукопротеидный слой, компоненты которого (мукопротеиды) продуцируются слизистой оболочкой матки. Постепенно прозрачная оболочка истончается и вместо

нее формируется внутренний слой – неозона. Ее компоненты формируются клетками трофэктодермы. Глоиолемма – внешний слой бластоцисты, который образуется последним в результате наслоения выделений маточных желез на мукопротеидный слой; таким образом, завершается формирование многослойной оболочки зрелой бластоцисты кролика (Böving, 1957; Denker, 2000; Menkhorst, Selwood, 2008). Эмбрион лошади, как и эмбрион кролика, теряет *zona pellucida*, которая на определенном этапе своего развития заменяется так называемой “капсулой” (Betteridge et al. 1982; Betteridge 1989). Это достаточно уникальная структура характерная для лошадиного эмбриона, которая, как и прозрачная оболочка, состоит из гликопротеида, но в отличие от нее не имеет пор (Betteridge, 1989). Капсула образуется уже на шестой день развития эмбриона лошади, когда он все еще покрыт *zona pellucida*, однако, уже начиная с седьмого дня после овуляции ооцита, эмбрион лошади защищен лишь капсулой (Betteridge et al. 1982; Betteridge 1989).

Согласно наблюдениям Дэнкера (Denker, 2000), дополнительные оболочки образуются не только у эмбрионов кролика и лошади, но и у бабуинов, морских котиков, скунса и некоторых других видов млекопитающих, хотя лишь у кролика и лошади эти оболочки достаточно полно изучены и охарактеризованы (Denker, 2000). Ранние исследования показали, что если эмбрионы коровы перенести в воронку яйцевода кролика, то на поверхности *zona pellucida* коровьих эмбрионов образуется тонкий муциновый слой (Adams, 1982). Большинство экспертов сходятся на том, что по крайней мере некоторые из дополнительных оболочек эмбрионов кролика, такие как глоиолемма, формируются под действием маточных желез, а сам зародыш не принимает участия в их образовании (Denker, 2000; Menkhorst, Selwood, 2008). В то же время было показано, что клетки трофобласта эмбриона являются основным источником материала для формирования капсулы развивающегося зародыша лошади (Albihn et al., 2003).

Имплантация у большинства млекопитающих происходит на стадии вылупившейся бластоцисты (Wimsatt, 1975). Хэтчинг (от англ. hatching – вылупление из яйца) – это процесс освобождения эмбриона от прозрачной оболочки. Хэтчинг проходит в два этапа. На первом этапе в бластоцель поступает большое количество воды, что приводит к увеличению объема бластоцисты; эта стадия выражена в разной мере у разных видов млекопитающих и в эмбриотехнологической литературе получила название “экспандированная бластоциста”. В результате этого процесса возрастает давление на стенки *zona pellucida* изнутри. На втором этапе клетки трофэктодермы эмбриона выделяют протеолитический фермент, который разру-

шает белки гликопротеидов прозрачной оболоч- ки, и бластоциста выходит через образовавшийся разрыв (Perona, Wassarman, 1986).

### ОБОЛОЧКИ ПРЕИМПЛАНТАЦИОННЫХ ЭМБРИОНОВ И ООЦИТОВ В СВЯЗИ С СОВРЕМЕННЫМИ РЕПРОДУКТИВНЫМИ ТЕХНОЛОГИЯМИ

#### *Роль оболочек преимплантационных эмбрионов и ооцитов в связи с их замораживанием и криоконсервацией*

Первые позитивные результаты по замораживанию преимплантационных зародышей мышей были получены в начале 1970-х годов (Whittingham et al. 1972, Wilmut, 1972). Вскоре были успешно заморожены и ооциты (яйцеклетки) – женские половые клетки мышей (Parkening et al., 1976; Whittingham, 1977). В настоящее время показано, что эмбрионы более чем сорока видов млекопитающих успешно подвергаются замораживанию и криоконсервации (Saragusty and Arav, 2011). Что же касается ооцитов, то до сих пор по отношению к большинству видов млекопитающих не существует эффективного протокола их замораживания, поэтому отдельные успехи не дают пока оснований для того, чтобы считать замораживание и криоконсервацию яйцеклеток столь же рутинной технологией, какими являются замораживание и криоконсервация эмбрионов и семени (Landel, 2005). Однако были опубликованы положительные результаты замораживания ооцитов крыс (Kasai et al., 1979), золотистых хомячков (Crister et al., 1986; Costa-Borges et al., 2009), кроликов (Al-Hasani et al., 1986), а также человека (Chen, 1986; Cook and Edgar, 2007). Имеются данные по эффективному замораживанию ооцитов кошек (Jewgenow et al. 1998). Наиболее же убедительные результаты получены при замораживании яйцеклеток человека (Cook and Edgar, 2007; Nagy et al., 2009; Noyes et al., 2010).

Повреждение *zona pellucida* является достаточно частым осложнением процедур замораживания/оттаивания эмбрионов (Lehn-Jensen and Rall, 1983; Rall and Meyer, 1989). Частые случаи повреждения прозрачной оболочки свидетельствуют о субоптимальных условиях замораживания (Lehn-Jensen and Rall, 1983; Van Den Abbeel and Van Steirteghem, 2000). Более того, зародыши с поврежденными оболочками или вообще лишенные оболочек не рекомендованы для международного обмена по санитарным соображениям (Van Zoom et al., 2010). Поскольку проницаемость оболочек эмбриона для воды и криопротекторов является важной компонентой успеха при программном замораживании (Saragusty and Arav, 2011), было бы вполне логичным полагать, что зародыши, у которых такая проницаемость низка,

хуже переживают эти процедуры. Эта гипотеза получила подтверждение в экспериментах с лошадиными зародышами. Ранние эмбрионы лошади (вымываемые на 6-й день беременности), у которых прозрачная оболочка еще не замещена “капсулой” достаточно эффективно замораживаются (Slade et al., 1985). Однако эмбрионы более поздних стадий (вымываемые на 7–8-й дни беременности) гораздо хуже выдерживают процедуры замораживания (Slade et al., 1985; Varfield et al., 2009). Низкая выживаемость зародышей лошадей после того, как прозрачная оболочка заменяется менее проницаемой капсулой, возможно, по крайней мере отчасти, связана именно с плохой проницаемостью капсулы для воды и криопротекторов (Legrand et al., 2002; Hochi, 2003). Действительно, была обнаружена обратная зависимость между толщиной капсулы и выживаемостью лошадиных эмбрионов в ходе замораживания и криоконсервации (Legrand et al., 1999). Более того, в одной из работ было показано, что эмбрионы лошади, которые обрабатывали трипсином перед замораживанием и у которых толщина капсулы уменьшалась, лучше переживали эту процедуру (Legrand et al., 2000).

В еще большей мере проблемы, вызванные взаимодействием процедур криоконсервации с оболочками, в данном случае прежде всего *zona pellucida* имеют место по отношению к замораживанию ооцитов (Saragusty and Arav, 2011). Наряду с другими проблемами, связанными с замораживанием ооцитов и перечисленными в специальных обзорных статьях (Cook and Edgar, 2007; Tao and Del Valle, 2008; Noyes et al., 2010), существует проблема “затвердевания прозрачной оболочки” (*zona hardening*), что обусловлено прежде всего выделением содержимого кортикальных гранул во время процедур замораживания-оттаивания. Это затрудняет или делает невозможным последующее оплодотворение таких яйцеклеток (Cargroll et al., 1990; Matson et al., 1997). Тем не менее число детей, рожденных после замораживания и криоконсервации ооцитов человека уже превысило 500 (Nagy et al., 2009). Эти успехи последнего времени дали основание поставить вопрос о том, что замораживание и криоконсервация ооцитов уже не являются сугубо “экспериментальными” процедурами, но скорее всего в самом скором будущем будут такими же рутинными технологиями, как и замораживание/криоконсервация эмбрионов (Noyes et al., 2010).

#### *Способы воздействия на оболочки ооцитов и эмбрионов с целью улучшения результатов экстракорпорального оплодотворения, криоконсервации и культивирования in vitro*

При получении эмбрионов путем экстракорпорального оплодотворения и последующего

культивирования *in vitro* характеристики прозрачной оболочки существенно отличаются от таковых у эмбрионов, развивавшихся в условиях *in vivo* (Van Soom et al., 2010). В частности, у эмбрионов, полученных *in vitro*, может изменяться плотность или толщина оболочки, но прямой корреляции между толщиной и плотностью прозрачной оболочки не обнаружено (Cohen et al., 1990).

С целью облегчения избавления эмбриона от прозрачной оболочки был разработан метод “вспомогательного хэтчинга”. Его применяют с разными целями: для улучшения результатов ЭКО (Wiemer et al., 1996; Hwang et al., 2000; Turetsky et al., 2008), для повышения эффективности процедур замораживания и криоконсервации эмбрионов (Legrand et al., 2000; Hershlag and Feng, 2005; Sifer et al., 2006) и, особенно, ооцитов (Anzai et al., 2006). Осуществляют данную процедуру различными способами (механическим, химическим, лазерным и пьезоэлектрическим). При применении первого (механического) способа прозрачную оболочку прокалывают микроиглой, не задевая расположенные под ней клетки (Cohen et al., 1990). При применении химического способа для перфорирования оболочки применяют кислый раствор Тироде (Cohen et al., 1990; Neev et al., 1993; Wiemer et al., 1996). При лазерном хэтчинге вместо микроиглы и кислотного раствора используют луч лазера, при помощи которого выжигают отверстие в прозрачной оболочке, причем луч направляют под таким углом, чтобы не задеть клетки эмбриона (Neev et al., 1993; Montag et al., 2000; Anzai et al., 2006). Используют также модификацию этого метода, когда луч лазера направляют таким образом, что он не перфорирует прозрачную оболочку, но делает ее локально более тонкой (Rink et al., 1996). К наиболее современному способу проведения вспомогательного хэтчинга относится пьезо-методика (Nakayama et al., 1998; Kawase et al., 2009). Как и в предыдущих случаях, эмбрион фиксируют микропипеткой. К прозрачной оболочке подводят микроманипулятор с вибрацией высокой частоты. С его помощью делают 5-10 конических углублений на небольшом участке оболочки эмбриона, что делает ее более тонкой в этой области (Nakayama et al., 1998; Kawase et al., 2009).

Было показано, что при вспомогательном хэтчинге человеческих эмбрионов, полученных путем ЭКО и культивировавшихся *in vitro*, улучшаются результаты последующей трансплантации этих эмбрионов реципиентам, причем возможно получить беременность даже в тех случаях, когда традиционное ЭКО не приводило к положительным результатам (Wiemer et al., 1996; Turetsky et al., 2008). Аналогичная ситуация характерна и для мышей (Hwang et al., 2000).

Процедуры, аналогичные вспомогательному хэтчингу, применяют в некоторых специальных случаях и для повышения эффективности процедур замораживания и криоконсервации. Воздействие на оболочки различными средствами с целью их утончения и улучшения характеристик их проницаемости с успехом было применено на мышиных (Hershlag and Feng, 2005), лошадиных (Legrand et al., 2000) и человеческих (Sifer et al., 2006) зародышах; при этом имело место улучшение результатов процесса замораживания. При применении лазерного перфорирования прозрачной оболочки ооцитов мышей эффективность процедур замораживания/криоконсервации и последующего ЭКО с применением семени мышей субфертильных линий возросла почти в 6 раз (с 11% до 60%) (Anzai et al., 2006). Другой подход заключался в частичной диссекции прозрачной оболочки (Nakagata et al., 1997) или частичном надрезе ее при помощи пьезомикроманипулятора (Kawase et al., 2009).

#### Иммуноконтрацепция

Иммуноконтрацепция — это процесс предотвращения зачатия путем вызывания аутоиммунной реакции на то или иное звено нормального репродуктивного процесса, что в конечном счете должно блокировать нормальное течение беременности на той или иной стадии. Образование антител может, например, приводить к иммобилизации и/или агглютинации сперматозоидов, связыванию рецепторов оболочки ооцита; также образование специфических антител может воздействовать на развивающийся зародыш или блокировать механизмы распознавания беременности материнским организмом (Bradley et al., 1999; Naz et al., 2005). Таким образом, антитела действуют как “префертилизационный контрацептив”, блокируя тем или иным способом взаимодействие сперматозоидов и яйцеклеток, либо как “постфертилизационный контрацептив”, препятствуя имплантации образовавшегося зародыша; при этом иммуноконтрацепция может происходить как на уровне самих гамет или зародышей, так и на уровне половых гормонов, необходимых для их успешного развития (Herr, 1996; Delves et al., 2002a, b). Весьма привлекательным и хорошо зарекомендовавшим себя на практике способом иммуноконтрацепции является иммунизация самок против гликопротеидов прозрачной оболочки ооцита/эмбриона; практически это достигается, когда основой вакцины являются компоненты прозрачной оболочки (Gupta, 1997; Lloyd et al., 2003; Hardy et al., 2004; Eade et al., 2009).

Иммуноконтрацепция была успешно применена в многочисленных лабораторных и полевых исследованиях, причем положительный эффект

получен как на уровне отдельных особей, так и на уровне популяций — более чем на 85 различных видах диких животных (Ringleb et al., 2004; Mackenzie et al., 2006; Duckworth et al., 2007; Nation et al., 2008; Eade et al., 2009; Kirkpatrick et al., 2011).

Наиболее оптимальным и универсальным способом иммуноконтрацепции по отношению к диким видам млекопитающих на сегодня является иммунизация самок гликопротеидами прозрачной оболочки ооцита свиньи. Именно такой способ иммуноконтрацепции дал устойчивый эффект регулирования численности популяций таких диких животных, как дикие лошади, олени, зубры и африканские слоны (Kirkpatrick et al., 2011). Успех в экспериментах по иммуноконтрацепции приматов (бабуинов и макак) (Martinez, Harris, 2000) явился предпосылкой создания контрацептивных вакцин для человека с целью планирования семьи (Delves et al., 2002a).

Однако несмотря на то что гликопротеиды прозрачной оболочки свиньи являются успешным методом иммуноконтрацепции для многих видов млекопитающих (Kirkpatrick et al., 2011), в некоторых случаях приходится создавать более специфичные для данного вида млекопитающих вакцины. Так, при иммунизации кошек гликопротеидами прозрачной оболочки свиньи титр иммунного ответа был высок, но контрацепция не достигалась, при иммунизации же против гликопротеидов прозрачной оболочки кошачьих ооцитов эффект контрацепции достигался (Eade et al. 2009).

Метод иммуноконтрацепции путем иммунизации самок гликопротеидами прозрачной оболочки ооцита является эффективным и наиболее гуманным способом регулирования численности животных, представляющих реальную проблему для биотопов или могущих быть резервуаром для инфекций, таких как: одичавшие кошки (Ringleb et al., 2004; Eade et al., 2009), опоссумы (Duckworth et al., 2007; Nation et al., 2008), мыши (Hardy et al., 2003; Lloyd et al., 2003; Hardy et al., 2004), кролики (Mackenzie et al., 2006) и многие другие.

Иммунизация ZP-гликопротеинами в опыте на животных приводила к блокаде фертильности (Martinez, Harris, 2000; Hardy et al., 2003; Lloyd et al., 2003; Hardy et al., 2004). В качестве основного компонента противозачаточных вакцин часто используют полипептидные фрагменты гликопротеидов прозрачной оболочки свиньи, которые в организме животного выступают как антигены, к которым будут вырабатываться антитела (Bradley et al., 1999; Delves et al., 2002b; Eade et al., 2009; Kirkpatrick et al., 2011). Эффективная контрацепция при помощи синтеза антител к ZP3 исследована на мышах линии BALB/c (Hardy et al., 2003; Lloyd et al., 2003; Hardy et al., 2004). Однако в некоторых случаях наблюдалось транзитное или

необратимое нарушение цикличности синтеза гормонов и, следовательно, созревания фолликулов. Для преодоления этих явлений делаются попытки расшифровать эпитопы ZP-гликопротеинов для выявления тех из них, к которым вырабатываются антитела, обладающие антифертильным действием, но не приводящие к нарушению функции яичников. Рекомбинантная технология делает возможным синтез специфичных эпитопов ZP-гликопротеинов в больших количествах для использования в контрацептивных целях (Bradley et al., 1999; Martinez, Harris, 2000).

### *Редеривация*

Задача редеривации заключается в получении здорового потомства от зараженных всевозможными патогенами животных. Редеривация может осуществляться различными способами (Брусенцев и др., 2011), но с 1980-х годов в качестве метода редеривации наиболее широко используют трансплантацию эмбрионов, которая является оптимальным способом очистки животных от подавляющего большинства патогенов (Carthew et al., 1983; Homberger, 1997; Morrell, 1999; Van Keuren, Saunders, 2004; Ike et al., 2007; Besselsen et al., 2008; Fray et al., 2008; Janus et al., 2009). Именно этот способ признается современными экспертами как “золотой стандарт” редеривации (Mahabir et al., 2008).

Прозрачная оболочка является естественной преградой для попадания инфекций различной природы внутрь эмбриона (Gwatkin, 1967; Peters et al., 2006; Van Soom et al., 2010), но именно на ней могут адсорбироваться некоторые вирусные частицы, от которых необходимо избавиться в процессе редеривации (Van Soom et al., 2009). Прозрачная оболочка меняется по мере развития эмбриона (Van Soom, 2010). На ранних стадиях доимплантационного развития она максимально плотная и непроницаема практически для всех патогенов (Mertens, 2006). Для редеривации эмбрионы вымывают у инфицированных самок-доноров на стадии морулы/бластоцисты и после соответствующих процедур очистки вводят в матку реципиента, свободного от специфичных патогенов (Carthew et al., 1983; Suzuki et al., 1996; Okamoto, Matsumoto, 1999; Peters et al., 2006), либо эмбрионы извлекают на более ранней (двухклеточной) стадии развития и вводят в воронку яйцевода реципиента (Mahabir et al., 2007; Besselsen et al., 2008; Janus et al., 2009; Pluck, Klasen, 2009). Перед трансплантацией эмбрионы отмывают в стерильной питательной среде, очищая их тем самым от патогенов. В ходе этой процедуры зародыши по одному многократно переносят из одной капли в другую, добываясь при каждом переносе разбавления 1 : 100 (Mahabir et al., 2007).

Прозрачная оболочка обладает устойчивостью к воздействию протеолитических ферментов, таких как трипсин и хемотрипсин (Bedford, 2004). Благодаря этому свойству при работе с эмбрионами сельскохозяйственных животных наряду с 10-кратным отмыванием в стерильных средах рекомендуют осуществлять инкубацию зародышей в растворе трипсина в течение 1.5 минут (Stringfellow, 1998; Angelo, 2009). Этого времени достаточно, чтобы разрушить адсорбированные на оболочке вирусы и при этом не повредить саму оболочку (Van Soom et al., 2010). При воздействии трипсином на прозрачную оболочку происходит ее истончение, что практически не сказывается на последующем развитии зародышей (Van Soom et al., 2010). Вирус лейкоза коров (BLV) вызывает распространенное и опасное заболевание крупного рогатого скота (Храмцов и др., 2003), поражает клетки лимфоцитарной ткани, но не способен проникать через прозрачную оболочку в бластомеры эмбриона. Редеривация путем трансплантации эмбрионов позволяет избавиться от данного патогена (Nage, 1985). При работе с эмбрионами лабораторных грызунов через раствор трипсина их обычно не промывают, однако рекомендовано производить их отмывание путем переноса через 10 капель со свежей стерильной средой, что является достаточным условием для избавления от большинства патогенов (Peters et al., 2006).

Ряд мелких вирусов, имеющих простое строение, представляют наибольшую проблему при осуществлении редеривации путем трансплантации эмбрионов. Этот метод является не вполне эффективным при очистке таких мелких вирусов мышей, как mouse minute virus (MMV) и mouse hepatitis virus (Mahabir et al., 2007; Mahabir et al., 2009), поскольку эти мелкие вирусы могут попадать в поры прозрачной оболочки мышиногo эмбриона, застревая в них, и переноситься при эмбриотрансплантации “чистому” реципиенту. Свиной парвовирус (PPV) может легко проникать в клетки эмбриона свиньи через прозрачную оболочку (Bane, 1990). Это обусловлено тем, что размер вирусной частицы очень маленький и составляет всего 18 нм (Bane, 1990). В поры прозрачной оболочки эмбрионов крупного рогатого скота может попадать и удерживаться там такой мелкий вирус, как бычий вирус диареи (BVDV), имеющий размер 40 нм (Vanroose, 2000). Также вирус бычьего герпеса типа 1 (BHV-1), имеющий размер 180 нм, может проникать через прозрачную оболочку и инфицировать клетки эмбриона (Макаревич, 2007).

У эмбрионов полученных *in vitro* поры прозрачной оболочки, как правило, более крупные, чем у полученных *in vivo*. Поэтому попадание вирусных частиц в поры и их адсорбция на поверхности прозрачной оболочки выше у первых. При

процедуре ЭКО шанс попадания вируса на прозрачную оболочку мыши очень низкий из-за окружающих ооцит фолликулярных клеток, которые могут предохранять ооцит (Mahabir et al., 2009).

При проведении редеривации путем трансплантации эмбрионов необходимо производить отбраковку зародышей со всевозможными разрывами прозрачной оболочки или полным ее отсутствием. Для обнаружения этих нарушений следует до начала отмывки рассмотреть зародыши при достаточно большом (80–100-кратном) увеличении и выбрать те из них, в которых отсутствуют повреждения прозрачной оболочки (Van Soom et al., 2010).

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Амстиславский С.Я., Максимовский Л.Ф., Воронников М.Т. Методы биотехнологии в практике разведения животных. Новосибирск: Изд-во ИЦиГ, 1991. 170 с.
- Брусенцев Е.Ю., Напимеров В.А., Амстиславский С.Я. Редеривация как способ очистки лабораторных животных // Вавиловский журнал генетики и селекции. 2011. Т. 15. № 1. С. 102–113.
- Корсак В.С. От опытов с искусственным оплодотворением кроликов до вспомогательных репродуктивных технологий // Журнал акушерства и женских болезней. 2004. № 1. С. 31–36.
- Лызикова Ю.А. Вспомогательные репродуктивные технологии в лечении бесплодия // Охрана материнства и детства. 2010. № 2. С. 80–83.
- Савельева Г.М., Курцер М.А., Краснопольская К.В., Ероян Л.Х. ЭКО в лечении бесплодия. Ведение беременности и родов // Журнал акушерства и женских болезней. 2003. № 3. С. 9–13.
- Храмцов В.В., Гулюкин М.И., Иванова Л.А. Разработка эффективных мероприятий против лейкоза крупного рогатого скота // Ветеринария. 2003. № 5.
- Шахова М.А. Вспомогательные репродуктивные технологии в лечении тяжелых форм мужского бесплодия // НМЖ. 2005. № 4. С. 101–106.
- Adams C.E. Egg transfer in carnivores and rodents between species and to ectopic sites // Adams C.E. (ed). Mammalian egg transfer. Boca Raton: C. R. C. Press, 1982. P. 49–61.
- Albihn A., Waelchli R.O., Samper J., Oriol J.G., Croy B.A., Betteridge K.J. Production of capsular material by equine trophoblast transplanted into immunodeficient mice // Reproduction. 2003. V. 125. P. 855–863.
- Al-Hasani S., Tolkendorf A., Diedrich K. et al. Successful *in vitro* fertilization of frozen-thawed rabbit oocytes // Hum. Reprod. 1986. V. 1. № 5. P. 309–312.
- Amstislavsky S. Reproductive Biology and Embryo Technology in Mustelidae. PhD Thesis. University of Kuopio, Kuopio, Finland, 2009. 149 p.
- Angelo M., Visintin J.A., Richtzenhain L.J., Gonçalves R.F. Evaluation of trypsin treatment on the inactivation of bovine herpesvirus type 1 on *in vitro* produced pre-im-

- plantation embryos // *Reprod. Domest. Anim.* 2009. V. 44. № 3. P. 536–539.
- Anzai M., Nishiwaki M., Yanagi M. et al. Application of laser-assisted zona drilling to *in vitro* fertilization of cryopreserved mouse oocytes with spermatozoa from a subfertile transgenic mouse // *J. Reprod. Dev.* 2006. V. 52. № 5. P. 601–606.
- Bane D.P., James J.E., Gradil C.M., Molitor T.W. *In vitro* exposure of preimplantation porcine embryos to porcine parvovirus // *Theriogenology*. 1990. V. 33. P. 553–561.
- Barfield J.P., McCue P.M., Squires E.L., Seidel G.E. Jr. Effect of dehydration prior to cryopreservation of large equine embryos // *Cryobiology*. 2009. V. 59. № 1. P. 36–41.
- Bedford J.M. Enigmas of mammalian gamete form and function // *Biol. Rev.* 2004. V. 79. P. 429–460.
- Besselsen D.G., Romero-Aleshire M.J., Munger S.J. et al. Embryo transfer rederivation of C. B-17/Icr-Prkdc(scid) mice experimentally infected with mouse parvovirus 1 // *Comp. Med.* 2008. V. 58. № 4. P. 353–359.
- Betteridge K.J., Eaglesome M.D., Mitchell D., Flood P.F., Bürriault R. Development of horse embryos up to twenty two days after ovulation: observations on fresh specimens. // *J. Anat.* 1982. V. 135. P. 191–209.
- Betteridge K.J. The structure and function of the equine capsule in relation to embryo manipulation and transfer // *Equine. Vet. J.* 1989. Suppl. 8. P. 92–100.
- Böving B.G. Rabbit egg coverings // *Anat. Rec.* 1957. V. 127. P. 270.
- Bradley M.P., Eade J., Penhale J., Bird P. Vaccines for fertility regulation of wild and domestic species // *J. Biotechnol.* 1999. V. 73. № 2. P. 91–101.
- Bronson R.A., McLaren A. Transfer to the mouse oviduct of eggs with and without the *zona pellucida* // *J. Reprod. Fertil.* 1970. V. 22. № 1. P. 129–137.
- Buhi W.C., Alvarez I.M., Kouba A.J. Secreted proteins of the oviduct // *Cells Tissues Organs*. 2000. V. 166. № 2. P. 165–179.
- Carroll J., Depypere H., Matthews C.D. Freeze-thaw-induced changes of the *zona pellucida* explains decreased rates of fertilization in frozen-thawed mouse oocytes // *J. Reprod. Fertil.* 1990. V. 90. № 2. P. 547–553.
- Carthew P., Wood M.J., Kirby C. Elimination of Sendai (parainfluenza type 1) virus infection from mice by embryo transfer // *J. Reprod. Fertil.* 1983. V. 69. № 1. P. 253–257.
- Check J.H., Choe J.K., Nazari A. Hyperreactio luteinalis despite the absence of a corpus luteum and suppressed serum follicle stimulating concentrations in a triplet pregnancy // *Hum. Reprod.* 2000. V. 15. № 5. P. 1043–1045.
- Chen C. Pregnancy after human oocyte cryopreservation // *Lancet*. 1986. № 1. P. 884–886.
- Cohen J., Elsner C., Kort H. et al. Impairment of the hatching process following IVF in the human and improvement of implantation by assisting hatching using micromanipulation // *Hum. Reprod.* 1990. V. 5. № 1. P. 7–13.
- Cook D.A., Edgar D.H. Human oocyte cryopreservation // *Hum. Reprod.* 2007. № 6. P. 591–605.
- Costa-Borges N., González S., Ibáñez E., Santalo' J. Collection and cryopreservation of hamster oocytes and mouse embryos // *J. Vis. Exp.* 2009. V. 27. P. 25.
- Crister J.K. et al. Influences of cumulus cell association during *in vitro* maturation of bovine oocytes on embryo development // *Society for the Study of Reproduction*. 1986. V. 34. P. 192–198.
- Delves P.J., Lund T., Roitt I.M. Future prospects for vaccines to control fertility // *Trends in Immunology*. 2002. V. 23. № 4. P. 220–221.
- Delves P.J., Lund T., Roitt I.M. Antifertility vaccines // *Trends in Immunology*. 2002. V. 23. № 4. P. 213–219.
- Denker H.-W. Structural dynamics and function of early embryonic coats // *Cell Tiss. Organs*. 2000. V. 166. P. 180–207.
- Duckworth J.A., Wilson K., Cui X., Molinia F.C., Cowan P.E. Immunogenicity and contraceptive potential of three infertility-relevant *zona pellucida* 2 epitopes in the marsupial brushtail possum (*Trichosurus vulpecula*) // *Reproduction*. 2007. V. 133. № 1. P. 177–186.
- Dudkiewicz A., Williams W. Fine structural observations of the mammalian *zona pellucida* by scanning electron microscopy // *Scan. Electron. Microsc.* 1977. V. 2. P. 317–324.
- Eade J.A., Roberston I.D., James C.M. Contraceptive potential of porcine and feline *zona pellucida* A, B and C subunits in domestic cats // *Reproduction*. 2009. V. 137. № 6. P. 913–922.
- Fray M.D., Pickard A.R., Harrison M., Cheeseman M.T. Upgrading mouse health and welfare: direct benefits of a large-scale rederivation programme // *Lab. Anim.* 2008. V. 42. № 2. P. 127–139.
- Gwatkin R.B. Passage of mengovirus through the *zona pellucida* of the mouse morula // *J. Reprod. Fertil.* 1967. V. 13. № 3. P. 577–578.
- Gupta S.K. Prospects of *zona pellucida* glycoproteins as immunogens for contraceptive vaccine // *Hum. Reprod. Update*. 1997. V. 3. № 4. P. 311–324.
- Hardy C.M., Clydesdale G., Mobbs K.J. Development of mouse-specific contraceptive vaccines: infertility in mice immunized with peptide and polypeptide antigens // *Reproduction*. 2004. V. 128. № 4. P. 395–407.
- Hardy C.M., ten Have J.F., Pekin J. et al. Contraceptive responses of mice immunized with purified recombinant mouse *zona pellucida* subunit 3 (mZP3) proteins // *Reproduction*. 2003. V. 126. № 1. P. 49–59.
- Hare W.C., Mitchell D., Singh E.L. et al. Embryo transfer in relation to bovine leukemia virus control and eradication // *Can. Vet. J.* 1985. V. 26. № 8. P. 231–234.
- Herr J.C. Update on the Center for Recombinant Gamete Contraceptive Vaccinogens // *Am. J. Reprod. Immunol.* 1996. V. 35. № 3. P. 184–189.
- Hershlag A., Feng H.L. Effect of prefreeze assisted hatching on postthaw survival of mouse embryos // *Fertility and Sterility*. 2005. V. 84. P. 1752–1754.
- Hill J.L., Walker S.K., Brown G.H., Nancarrow C.D. The effects of an estrus-associated oviductal glycoprotein on the *in vitro* fertilization and development of ovine



- oocytes matured *in vitro* // Ther. 1996. V. 46. P. 1379–1388.
- Hinsch K.D., Hinsch E., Meinecke B. et al. Identification of mouse ZP3 protein in mammalian oocytes with antisera against synthetic ZP3 peptides // Biol. Reprod. 1994. V. 51. № 2. P. 193–204.
- Hochi S. Cryopreservation of follicular oocytes and preimplantation embryos in cattle and horses // J. Reprod. Dev. 2003. V. 49. № 1. P. 13–21.
- Homberger F.R. Enterotropic mouse hepatitis virus // Lab. Anim. 1997. V. 31. № 2. P. 97–115.
- Hwang S., Lee E., Chung Y. et al. Intactness of *zona pellucida* does not affect the secretion of a trypsin-like protease from mouse blastocyst // J. Korean. Med. Sci. 2000. V. 15. № 5. P. 529–532.
- Ike F., Bourgade F., Ohsawa K. et al. Lymphocytic choriomeningitis infection undetected by dirty-bedding sentinel monitoring and revealed after embryo transfer of an inbred strain derived from wild mice // Comp. Med. 2007. V. 57. № 3. P. 272–281.
- Janus L.M., Smoczek A., Hedrich H.J., Bleich A. Risk assessment of minute virus of mice transmission during rederivation: detection in reproductive organs, gametes, and embryos of mice after *in vivo* infection // Biol. Reprod. 2009. V. 81. № 5. P. 1010–1015.
- Jewgenow K., Penfold L.M., Meyer H.H., Wildt D.E. Viability of small preantral ovarian follicles from domestic cats after cryoprotectant exposure and cryopreservation // J. Reprod. Fertil. 1998. V. 112. № 1. P. 39–47.
- Kasai M., Iritani A., Chang M.C. Fertilization *in vitro* of rat ovarian oocytes after freezing and thawing // Biol. Reprod. 1979. V. 21. № 4. P. 839–844.
- Kawase Y., Tachibe T., Hani T. et al. Effect of zona incision by piezo-micromanipulator (ZIP) on *in vitro* fertilization in 21 transgenic mice lines // Exp. Anim. 2009. V. 58. № 4. P. 415–419.
- Kirkpatrick J.F., Lyda R.O., Frank K.M. Contraceptive Vaccines for Wildlife: A Review // Am. J. Reprod. Immunol. 2011. P. 1–11.
- Landel C. Archiving mouse strains by cryopreservation // Lab. Anim. 2005. V. 34. P. 50–57.
- Lehn-Jensen H., Rall W. Cryomicroscopic observations of cattle embryos during freezing and thawing // Theriogenology. 1983. V. 19. P. 263–277.
- Legge M. Oocyte and zygote *zona pellucida* permeability to macromolecules // J. Exp. Zool. 1995. V. 271. № 2. P. 145–150.
- Legrand E., Bencharif D., Barrier-Battut I. et al. Comparison of pregnancy rates for days 7–8 embryos frozen in glycerol with and without previous enzymatic treatment of their capsule // Theriogenology. 2002. V. 58. P. 721–723.
- Legrand E., Krawiecki J.M., Tainturier D. et al. Does the embryonic capsule impede the freezing of equine embryos? // Proceeding of the 5th International Symposium on Equine Embryo Transfer. Saari, Finland. 2000. Havemeyer Foundation Monograph Series 3. P. 62–65.
- Legrand E., Bencharif D., Battut I. et al. Horse embryo freezing: influence of thickness of the capsule // Proceedings of the 15th Scientific Meeting of the European Embryo Transfer Association. 1999. P. 184–185.
- Liu C., Litscher E.S., Mortillo S. et al. Targeted disruption of the mZP3 gene results in production of eggs lacking a *zona pellucida* and infertility in female mice // PNAS 1996. V. 93. P. 5431–5436.
- Lloyd M.L., Shellam G.R., Papadimitriou J.M., Lawson M.A. Immunocontraception is induced in BALB/c mice inoculated with murine cytomegalovirus expressing mouse *zona pellucida* 3 // Biol. Reprod. 2003. V. 68. № 6. P. 2024–2032.
- Mackenzie S.M., McLaughlin E.A., Perkins H.D. et al. Immunocontraceptive effects on female rabbits infected with recombinant myxoma virus expressing rabbit ZP2 or ZP3 // Biol. Reprod. 2006. V. 74. № 3. P. 511–521.
- Mahabir E., Reindl K., Mysliwicz J. et al. Impairment of germline transmission after blastocyst injection with murine embryonic stem cells cultured with mouse hepatitis virus and mouse minute virus // Transgenic Res. 2009. V. 18. № 1. P. 45–57.
- Mahabir E., Bauer B., Schmidt J. Rodent and germplasm trafficking: risks of microbial contamination in a high-tech biomedical world // ILAR J. 2008. V. 49. № 3. P. 347–355.
- Mahabir E., Bulian D., Needham J. et al. Transmission of mouse minute virus (MMV) but not mouse hepatitis virus (MHV) following embryo transfer with experimentally exposed *in vivo*-derived embryos // Biol. Reprod. 2007. V. 76. № 2. P. 189–197.
- Makarevich A.V., Pivko J., Kubovicova E. et al. Development and viability of bovine preimplantation embryos after the *in vitro* infection with bovine herpesvirus-1 (BHV-1): immunocytochemical and ultrastructural studies // Zygote. 2007. V. 15. P. 307–315.
- Martinez M.L., Harris J.D. Effectiveness of *zona pellucida* protein ZPB as an immunocontraceptive antigen // J. Reprod. Fertil. 2000. V. 120. № 1. P. 19–32.
- Matson P.L., Graefling J., Junk S.M. et al. Cryopreservation of oocytes and embryos: use of a mouse model to investigate effects upon zona hardness and formulate treatment strategies in an *in vitro* fertilization programme // Hum. Reprod. 1997. V. 12. № 7. P. 1550–1553.
- Menkhorst E., Selwood L. Vertebrate extracellular preovulatory and postovulatory egg coats // Biol. Reprod. 2008. V. 79. P. 790–797.
- Mertens E.M. Der Einfluss der *in vitro* Kultur boviner Embryonen auf die Struktur der extraembryonalen Matrix (*Zona pellucida*): eine rasterelektronen- und lichtmikroskopische Studie // Ph. D. Thesis, Tierärztliche Hochschule Hannover, Germany. 2006.
- Moller C.C., Bleil J.D., Kinloch R.A., Wassarman P.M. Structural and functional relationships between mouse and hamster *zona pellucida* glycoproteins // Dev. Biol. 1990. V. 137. № 2. P. 276–286.
- Montag M., Koll B., van der Ven H. Use of a laser to evaluate *zona pellucida* hardness at different stages of mouse embryonic development *in vitro* and *in vivo* // J. Assist. Reprod. Genet. 2000. V. 17. № 3. P. 178–181.
- Morrell J.M. Techniques of embryo transfer and facility decontamination used to improve the health and welfare of transgenic mice // Lab. Anim. 1999. V. 33. № 3. P. 201–206.
- Murray M., Messinger S.M. Early embryonic development in the Djungarian hamster (*Phodopus sungorus*) is ac-

- accompanied by alterations in the distribution and intensity of an estrogen (E2)-dependent oviduct glycoprotein in the blastomere membrane and *zona pellucida* and in its association with F-actin // *Biol. Reprod.* 1994. V. 51. № 6. P. 1126–1139.
- Nagdas S.K., Araki Y., Chayko C.A. et al. O-linked trisaccharide and N-linked poly-N-acetyllactosaminyl glycans are present on mouse ZP2 and ZP3 // *Biol. Reprod.* 1994. V. 51. № 2. P. 262–272.
- Nagy Z.P., Chang C.C., Shapiro D.B. et al. The efficacy and safety of human oocyte vitrification // *Semin. Reprod. Med.* 2009. V. 27. № 6. P. 450–455.
- Nakagata N., Okamoto M., Ueda O., Suzuki H. Positive effect of partial zona-pellucida dissection on the *in vitro* fertilizing capacity of cryopreserved C57BL/6J transgenic mouse spermatozoa of low motility // *Biol. Reprod.* 1997. V. 57. № 5. P. 1050–1055.
- Nakayama T., Fujiwara H., Tastumi K. et al. A new assisted hatching technique using a piezo-micromanipulator // *Fertil. Steril.* 1998. V. 69. № 4. P. 784–788.
- Nation A., Cui S., Selwood L. Vesicle-associated protein 1: a novel ovarian immunocontraceptive target in the common brushtail possum, *Trichosurus vulpecula* // *Reproduction.* 2008. V. 136. № 5. P. 657–665.
- Naz R.K., Gupta S.K., Gupta J.C. et al. Recent advances in contraceptive vaccine development: a mini-review // *Hum. Reprod.* 2005. V. 20. № 12. P. 3271–3283.
- Neev J., Gonzalez A., Licciardi F. et al. Opening of the mouse *zona pellucida* by laser without a micromanipulator // *Hum. Reprod.* 1993. № 6. P. 939–944.
- Nikolettos N., Al-Hasani S., Baukloh V. et al. The outcome of intracytoplasmic sperm injection in patients with retrograde ejaculation // *Hum. Reprod.* 1999. V. 14. № 9. P. 2293–2296.
- Noyes N., Boldt J., Nagy Z.P. Oocyte cryopreservation: is it time to remove its experimental label? // *J. Assist. Reprod. Genet.* 2010. V. 27. P. 69–74.
- Okamoto M., Matsumoto T. Production of germfree mice by embryo transfer // *Exp. Anim.* 1999. V. 48. № 1. P. 59–62.
- Palermo G.D., Alikani M., Bertoli M. et al. Oolemma characteristics in relation to survival and fertilization patterns of oocytes treated by intracytoplasmic sperm injection // *Hum. Reprod.* 1996. V. 11. № 1. P. 172–176.
- Palermo G., Joris H., Devroey P., Van Steirteghem A.C. Pregnancies after intracytoplasmic injection of single spermatozoon into an oocyte // *Lancet.* 1992. V. 340. P. 17–18.
- Papanikolaou E.G., Kolibianakis E.M., Tournaye H. et al. Live birth rates after transfer of equal number of blastocysts or cleavage-stage embryos in IVF. A systematic review and meta-analysis // *Hum. Reprod.* 2008. V. 23. № 1. P. 91–99.
- Parkening T.A., Tsunoda Y., Chang M.C. Effects of various low temperatures, cryoprotective agents and cooling rates on the survival, fertilizability and development of frozen-thawed mouse eggs // *J. Exp. Zool.* 1976. V. 197. P. 369–374.
- Perona R.M., Wassarman P.M. Mouse blastocysts hatch *in vitro* by using a trypsin-like proteinase associated with cells of mural trophoctoderm // *Dev. Biol.* 1986. V. 114. № 1. P. 42–52.
- Peters D.D., Marschall S., Mahabir E. et al. Risk assessment of mouse hepatitis virus infection via *in vitro* fertilization and embryo transfer by the use of zona-intact and laser-microdissected oocytes // *Biol. Reprod.* 2006. V. 74. № 2. P. 246–252.
- Pluck A., Klasen C. Surgical techniques for the generation of mutant mice // *Methods Mol. Biol.* 2009. V. 561. P. 231–243.
- Rall W., Meyer T. Zona fracture damage and its avoidance during the cryopreservation of mammalian embryos // *Theriogenology.* 1989. V. 31. P. 683–692.
- Rankin T., Soyol S., Dean J. The mouse *zona pellucida*: folliculogenesis, fertility and preimplantation development // *Mol. Cell. Endocrinol.* 2000. V. 163. P. 21–25.
- Ringleb J., Rohleder M., Jewgenow K. Impact of feline *zona pellucida* glycoprotein B-derived synthetic peptides on *in vitro* fertilization of cat oocytes // *Reproduction.* 2004. V. 127. № 2. P. 179–186.
- Rink K., Delacrétaz G., Salathé R.P. et al. Non-contact microdrilling of mouse *zona pellucida* with an objective-delivered 1.48-microns diode laser // *Lasers Surg. Med.* 1996. V. 18. № 1. P. 52–62.
- Saragusty J., Arav A. Current progress in oocyte and embryo cryopreservation by slow freezing and vitrification // *Reproduction.* 2011. V. 141. P. 1–19.
- Schwartz P., Magerkurth C., Michelmann H. W. Scanning electron microscopy of the *zona pellucida* of human oocytes during intracytoplasmic sperm injection (ICSI) // *Hum. Reprod.* 1996. V. 11. P. 2693–2696.
- Senger P.L. Pathways to Pregnancy and Parturition. 2<sup>nd</sup> revised edition. Current Conceptions, Inc. Washington State University Research & Technology Park, Pullman, Washington, 2003.
- Shulman A., Feldman B., Madgar I. et al. In-vitro fertilization treatment for severe male factor: the fertilization potential of immotile spermatozoa obtained by testicular extraction // *Hum. Reprod.* 1999. V. 14. № 3. P. 749–752.
- Sifer C., Sellami A., Poncelet C. et al. A prospective randomized study to assess the benefit of partial *zona pellucida* digestion before frozen-thawed embryo transfers // *Hum. Reprod.* 2006. V. 21. № 9. P. 2384–2389.
- Sills E.S., Palermo G.D. Human blastocyst culture in IVF: current laboratory applications in reproductive medicine practice // *Rom. J. Morphol. Embryol.* 2010. V. 51. № 3. P. 441–445.
- Slade N.P., Takeda T., Squires E.L. et al. A new procedure for the cryopreservation of equine embryos // *Theriogenology.* 1985. V. 24. № 1. P. 45–58.
- Soupart P., Strong P.A. Ultrastructural observations on polyspermic penetration of *zona pellucida*-free human oocytes inseminated *in vitro* // *Fertil. Steril.* 1975. V. 26. № 6. P. 523–537.
- Stringfellow D.A. Recommendation for the sanitary handling of *in vivo*-derived embryos // *Manual of the International Embryo Transfer Society.* 1998. P. 79–84.
- Suzuki H., Yorozu K., Watanabe T. et al. Rederivation of mice by means of *in vitro* fertilization and embryo transfer // *Exp. Anim.* 1996. V. 45. № 1. P. 33–38.
- Tao T., Valle A.D. Human oocyte and ovarian tissue cryopreservation and its application // *J. Assist. Reprod. Genet.* 2008. V. 25. P. 287–296.

- Turetsky T., Aizenman E., Gil Y. et al.* Laser-assisted derivation of human embryonic stem cell lines from IVF embryos after preimplantation genetic diagnosis // *Hum. Reprod.* 2008. V. 23. № 1. P. 46–53.
- Turner K., Horobin R.W.* Permeability of the mouse *zona pellucida*: a structure-staining-correlation model using coloured probes // *J. Reprod. Fertil.* 1997. V. 111. № 2. P. 259–265.
- Van Den Abbeel E., Van Steirteghem A.* *Zona pellucida* damage to human embryos after cryopreservation and the consequences for their blastomere survival and in-vitro viability // *Hum. Reprod.* 2000. V. 15. № 2. P. 373–378.
- Van Keuren M.L., Saunders T.L.* Rederivation of transgenic and gene-targeted mice by embryo transfer // *Transgenic Res.* 2004. V. 13. № 4. P. 363–371.
- Van Soom A., Wrathall A.E., Herrler A., Nauwynck H.J.* Is the *zona pellucida* an efficient barrier to viral infection? // *Reprod. Fertil. Dev.* 2010. V. 22. P. 21–31.
- Van Soom A., Nauwynck H.J., Wrathall A.E.* Scientific foundations of the epidemiological safety of embryo transfer // *Manual of the International Embryo Transfer Society: a Procedural Guide* <http://www.publish.csiro.au/journals/rfd> and General Information for the Use of Embryo Transfer Technology, Emphasizing Sanitary Procedures. 2009. 4th edn. P. 13–40.
- Vanroose G., Nauwynck H., Van Soom A. et al.* Structural aspects of the *zona pellucida* of *in vitro*-produced bovine embryos: a scanning electron and confocal laser scanning microscopic study // *Biol. Reprod.* 2000. V. 62. P. 463–469.
- Vazquez M.H., Phillips D.M., Wassarman P.M.* Interaction of mouse sperm with purified sperm receptors covalently linked to silica beads // *J. Cell. Sci.* 1989. V. 92. № 4. P. 713–722.
- Verheyen G., Tournaye H., Staessen C. et al.* Controlled comparison of conventional in-vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection in patients with asthenozoospermia // *Hum. Reprod.* 1999. V. 14. № 9. P. 2313–2319.
- Wassarman P.M.* *Zona pellucida* glycoproteins // *Annu. Rev. Biochem.* 1988. V. 57. P. 415–442.
- Whittingham D.G.* Fertilization *in vitro* and development to term of unfertilized mouse oocytes previously stored at 196 degrees C // *J. Reprod. Fertil.* 1977. V. 49. № 1. P. 89–94.
- Whittingham D.G., Leibo S.P., Mazur P.* Survival of mouse embryos frozen to K196 8C and K269 8C // *Science.* 1972. V. 178. P. 411–414.
- Wiemer K.E., Garrisi J., Steuerwald N. et al.* Beneficial aspects of co-culture with assisted hatching when applied to multiple-failure in-vitro fertilization patients // *Hum. Reprod.* 1996. V. 11. № 11. P. 2429–2433.
- Wilmut I.* The effect of cooling rate, warming rate, cryoprotective agent and stage of development of survival of mouse embryos during freezing and thawing // *Life Sciences.* 1972. V. 11. P. 1071–1079.
- Wimsatt W.A.* Some comparative aspects of implantation // *Biol. Reprod.* 1975. V. 12. P. 1–40.

## Coats of Preimplantation Mammalian Embryos as a Target of Reproductive Technologies

I. N. Rozhkova<sup>a</sup>, E. Y. Brusensev<sup>a</sup>, and S. Ya. Amstislavskii<sup>a,b</sup>

<sup>a</sup> Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, 630090 Russia

<sup>b</sup> Novosibirsk State University, Novosibirsk, 630090 Russia

e-mail: amstis@bionet.nsc.ru

**Abstract**—The structure and function of the mammalian oocyte and preimplantation embryo coverings are described in this review. The integrity of embryonic coverings is the main prerequisite for the success of such technology as preimplantation embryo freezing and, especially, for successful redifferentiation. On the other hand, results of *in vitro* fertilization and, sometimes, the results of embryo freezing are improved after perforation of the oocyte/embryonic coverings. Modern reproductive technologies focusing on oocyte/embryonic coverings, such as preimplantation embryo freezing/cryopreservation, *in vitro* fertilization, intracytoplasmic sperm injection, assisted hatching, immunocontraception, and redifferentiation, are reviewed. Application of these technologies to different mammalian species is discussed with a special emphasis on the oocytes/preimplantation embryos coverings.

**Keywords:** embryonic coats, cryopreservation, IVF, assisted hatching, immunocontraception, redifferentiation