

Е. Н. Шедова, А. В. Лопухов

Влияние продолжительности воздействия циклогексимида и 6-диметиламинопурина (6-ДМАП) на развитие клонированных эмбрионов крупного рогатого скота

Аннотация. Циклогексимид и 6-диметиламинопурина (6-ДМАП) широко используются в протоколах по клонированию ядер соматических клеток (*somatic cell nuclear transfer, SCNT*) для ингибирования активности MPF (*maturation promoting factor*) в SCNT-ооцитах в пост-активационный период их культивирования. Тем не менее, следует помнить, что данные вещества обладают широким спектром действия и могут мешать другим клеточным процессам. Определение оптимального периода культивирования SCNT-ооцитов в присутствии указанных выше ингибиторов, очевидно, может способствовать предотвращению нежелательных негативных последствий. В данной работе влияние продолжительности воздействия 6-ДМАП (2 мМ) и циклогексимида (10 мкг/мл) (3,0, 4,0 или 5,0 часов) на перепрограммирование соматического ядра, оценивали по способности активированных SCNT-ооцитов вступать в первое деление дробление и достигать стадии бластоцисты, а также по общему числу ядер и уровню апоптоза в полученных бластоцистах. Доля раздробившихся ооцитов, не различалась между экспериментальными группами, и варьировала от 63,7 до 77,0%. Кроме того, не обнаружено влияние продолжительности воздействия исследуемых факторов на развитие активированных цитогридов до стадии бластоцисты. При воздействии в течение 3,0 ч выход бластоцист составлял $19,6 \pm 1,8\%$. Удлинение продолжительности культивирования до 4,0 и 5,0 ч не изменяло данный показатель. Тем не менее выявлено влияние длительности культивирования в присутствии циклогексимида и 6-ДМАП на качество клонированных эмбрионов. В случае воздействия указанных ингибиторов в течение 3 ч среднее число ядер в бластоцистах было $58,8 \pm 2,4$. С увеличением продолжительности до 4 часов данный показатель возрастал до $76,6 \pm 1,4$ ($p < 0,05$), а более длительное воздействие (5 часов) ухудшало качество бластоцист по сравнению с 4-х часовым периодом ($p < 0,05$). Доля ядер в эмбрионах с признаками апоптоза не различалась между экспериментальными группами и варьировала от 5,4 до 7,0%. Таким образом, нами подтверждено, что эффективность получения клонированных эмбрионов крупного рогатого скота предимплантационных стадий развития зависит от времени воздействия 6-ДМАП и циклогексимида на SCNT-ооцитах в пост-активационный период их культивирования *in vitro*. Оптимальной продолжительностью применительно к описанному нами протоколу SCNT с точки зрения качества эмбрионов является 4 часа.

Ключевые слова: крупный рогатый скот, соматическое клонирование, активация, эмбриональное развитие.

Авторы:

Шедова Екатерина Николаевна — научный сотрудник; e-mail: shedvek@yandex.ru;

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

ФГБНУ Федеральный исследовательский центр животноводства — ВИЖ им. академика Л. К. Эрнста, лаборатория экспериментальной эмбриологии; 142132, Россия, Московская обл., городской округ Подольск, пос. Дубровицы, 60.

Введение. Технология клонирования ядер соматических клеток (*somatic cell nuclear transfer, SCNT*) в сочетании методами геномного редактирования имеет широкие перспективы применения в скотоводстве для решения задач, направленных на создание новых генотипов, в том числе с измененными хозяйственно полезными признаками [1–5]. Однако эффективность SCNT, в том числе у крупного рогатого скота с точки зрения получения эмбрионов высокого качества остается

низкой, высока частота аборт и перинатальной смертности, а также рождения потомства с низкой жизнеспособностью, что сдерживает внедрение данной технологии в практику [6–8].

Известно, что основой успешного клонирования является способность донорского ядра соматической клетки перепрограммироваться в направлении тотипотентного состояния и, что соответствующие трансформации ядра клетки (кариопласта) опосредуются факторами цитоплазмы ооцита (ци-

топласта) и начинаются с момента их объединения (слияния) [9]. Клонированные цитогбриды, полученные в результате слияния цитопласта и кариопласта, для запуска последующего эмбрионального развития активируют с использованием искусственных стимулов (иономицин, кальциевый ионофор и др.) при воздействии которых (также, как при оплодотворении) происходит однократное неконтролируемое повышение концентрации Ca^{2+} в цитозоле, экзоцитоз кортикальных гранул и формирование пронуклеусов [10, 11]. Действие активирующих стимулов, напрямую зависит от степени ингибирования активности MPF (maturation promoting factor) в SCNT-ооцитах в пост-активационный период их культивирования [12, 13]. Наилучшие результаты наблюдаются в случае использования для этого таких неспецифических ингибиторов как циклогексимид и 6-диметиламинопурин (6-ДМАП) [14–16].

В рамках представленной работы проводилась оценка влияния продолжительности воздействия 6-ДМАП и циклогексимида в пост-активационный период культивирования цитогбридов (в силу неоднозначности данных) на эффективность клонирования у крупного рогатого скота. Изучали воздействие данных факторов на формирование эмбрионов и их развитие до стадии бластоцисты.

Материалы и методы. Для SCNT яичники коров, отобранные после убоя, доставляли в лабораторию в течение 3–5 ч при 30–35°C, освобождали от прилегающих тканей и многократно отмывали в стерильном физиологическом растворе с антибиотиками (пенициллин — 100 МЕ/мл, стрептомицин — 50 мкг/мл). Ооцит-кумулосные комплексы (ОКК) выделяли из яичников, рассекая стенки фолликулов лезвием, промывали 3 раза в среде TC199, содержащей 10% ФБС и гентамицин (50 мкг/мл) (TC199-M), дополненной 10 мкг/мл гепарина и проводили морфологическую оценку извлеченных ОКК. Для дальнейшего культивирования использовали ооциты округлой формы, с гомогенной цитоплазмой, равномерной по ширине зоной пеллюцида, окруженные многослойным компактным кумулюсом. Отобранные по качеству ОКК культивировали с целью созревания группами по 20–30 шт. в 500 мкл среды TC-199, содержащей 10% ФБС, 1 мМ пируват натрия, гентамицин (50 мкг/мл), ФСГ (10 мкг/мл) и ЛГ (10 мкг/мл) в течение 19–21 часа.

Донорскими клетками служили фетальные фибробласты (ФФБ) крупного рогатого скота. Хранившиеся при — 196°C ФФБ, размораживали в водяной бане при 37°C, содержимое переносили в центрифужную пробирку с 10 мл DMEM («Gibco», США, Кат. № 31966021), содержащей 5%

фетальной бычьей сыворотки (ФБС) и 50 мкг/мл гентамицина, центрифугировали при 1500 об/мин, после чего клетки культивировали в среде DMEM («Gibco», США, Кат. № 31966021), дополненной 15% ФБС, 1% несущественных аминокислот и 50 мкг/мл гентамицина до сформированного монослоя, контактно ингибировали в течение 2 суток с целью синхронизации клеточного цикла и к процедуре переноса в энуклеированный ооцит готовили в виде суспензии в среде TC199-M.

Созревшие ооциты освобождали от клеток кумулюса посредством инкубации ОКК в 0,1% растворе гиалуронидазы (в среде TC199-M) в течение 1 мин при 37°C и последующей дезагрегации комплексов пипетированием. Для процедуры клонирования отбирали только ооциты с первым поллярным тельцем (ППТ).

Микрохирургические манипуляции (группами по 15–20 ооцитов) проводились в каплях среды TC199-M объемом 20 мкл, нанесенных на дно чашек Петри, покрытых слоем минерального масла с использованием инвертированного микроскопа совмещенного с микроманипуляционной техникой Narishige. В процессе реконструирования ооциты фокусировали с помощью удерживающей пипетки в поле зрения микроскопа в положении позволяющем четко визуализировать ППТ в перивителлиновом пространстве ооцита на 1 или 5 часов условного циферблата. Микропипетку для биопсии (внутренний диаметр 13–15 мкм) подвели вплотную к оболочке ооцитов, прокалывали зону пеллюцида в месте локализации ППТ и хромосомы яйцеклетки удаляли в слепую аспирацией ППТ и 10–20% прилежащей цитоплазмы. Соматическую клетку вводили в перивителлиновое пространство зафиксированного ооцита микропипеткой, используемой ранее для биопсии ППТ, через отверстие, сформированное в процессе энуклеации.

Объединение энуклеированного ооцита и соматической клетки с целью получения клонированного цитогбрида проводили методом электрослияния с использованием мультипоратора фирмы «Eppendorf». Комплексы ооцит/соматическая клетка помещали в предварительно заполненную буфером (270 мМ маннитола, 0,1 мМ MgSO_4 , 0,05 мМ CaCl_2) микрокамеру с расстоянием между электродами 0,2 мм и подвергали воздействию двух последовательных прямоугольных импульсов постоянного тока напряжением 35 В продолжительностью 20 мкс. Обработанные таким образом клеточные комплексы затем переносили в 50 мкл капли среды TC199-M покрытым слоем минерального масла для кратковременного культивирования. Через 1 ч инкубации оценивали об-

разование из комплексов ооцит/соматическая клетка морфологически нормальных клонированных цитогибридов и проводили их отбор.

Полученные цитогбриды активировали через 2,0 ч после слияния путем инкубации в растворе Тироде [17], содержащем 5 мМ иономицина в течение 5 минут, с последующим культивированием реконструированных ооцитов в среде CR1aa [18] содержащей 2 мМ 6-ДМАП и 10 мкг/мл циклогексимида. Через 3–5 ч предполагаемые зиготы переносили в среду CR1aa и культивировали в течение 4 сут, после чего развивающиеся эмбрионы помещали в ту же среду, содержащую 5% ФБС. На 2-е сутки после активации цитогбридов проводили морфологическую оценку раздробившихся зигот, на 7-е сутки определяли число эмбрионов, развившихся до стадии бластоцисты.

Полученные бластоцисты фиксировали 4% раствором параформальдегида и подвергали процедуре пермеабиллизации в растворе Triton X-100. Степень апоптотических изменений ядерного материала в эмбрионах определяли методом TUNEL с использованием набора In Situ Cell Death Detection Kit, fluorescein («Roche Diagnostics», Швейцария) согласно инструкции компании-производителя. Затем эмбрионы окрашивали раствором DAPI (1 мкг/мл) с целью локализации ядер, переносили на стекло для анализа. Микрофотографирование и оценку препаратов выполняли под флуоресцентным микроскопом Axio Imager.M2, оснащенным фильтром 65 HE (для TUNEL, возбуждение 445–470) и 49 (для DAPI, возбуждение 365), с использованием цифровой камеры AxioCam 506 и программы ZEN 2 pro («Carl Zeiss», Германия). Степень апоптоза в эмбрионах оценивали по доле TUNEL-позитивных ядер от общего числа ядер.

Статистическую обработку данных проводили методом однофакторного дисперсионного анализа при помощи компьютерной программы Sigma-Stat. Результаты экспериментов представлены в виде средних значений ($\bar{X}$) и стандартных ошибок ($\pm$ SEM). Для оценки достоверности различий между сравниваемыми средними значениями использовали критерий Тьюки.

Результаты и обсуждение. Условия активации SCNT-ооцитов (цитогбридов) критически влияют на последующее развитие клонированных эмбрионов [12–14]. Под воздействием искусственных стимулов (электрический импульс, иономицин и др.) в ядре соматической клетки (интегрированной в ооцит в процессе слияния) инициируются процессы перепрограммирования, которые необходимы ей для возвращения в тотипотентное состояние [9]. При этом эффективность актива-

ции и последующего эмбрионального развития напрямую зависит от воздействия на ооциты неспецифических ингибиторов активности MPF, таких как циклогексамид и 6-DMAP [13, 19].

Циклогексимида и 6-DMAP широко используются в протоколах SCNT в том числе у крупного рогатого скота [14–16], но следует помнить, что данные вещества обладают широким спектром действия и могут мешать другим клеточным процессам [19]. Определение оптимального периода культивирования клонированных цитогбридов в присутствии указанных выше ингибиторов, очевидно, может способствовать предотвращению нежелательных негативных последствий [20].

В данной работе влияние продолжительности воздействия 6-ДМАП и циклогексимида (3,0, 4,0 или 5,0 часов) на перепрограммирование соматического ядра, оценивали по способности активированных цитогбридов ($n=233$) вступать в первое деление дробления и достигать стадии бластоцисты (рис. 1). Доля раздробившихся ооцитов, определяемая на 2-й день культивирования, не различалась между экспериментальными группами, и составляла $63,7 \pm 3,9$; $77,0 \pm 2,6$ и $65,2 \pm 3,6\%$ для 3,0, 4,0 и 5,0 ч, соответственно. Кроме того, не обнаружено влияние продолжительности воздействия исследуемых факторов на развитие активированных цитогбридов до стадии бластоцисты. При воздействии в течение 3,0 ч выход бластоцист составлял $19,6 \pm 1,8\%$. Удлинение продолжитель-

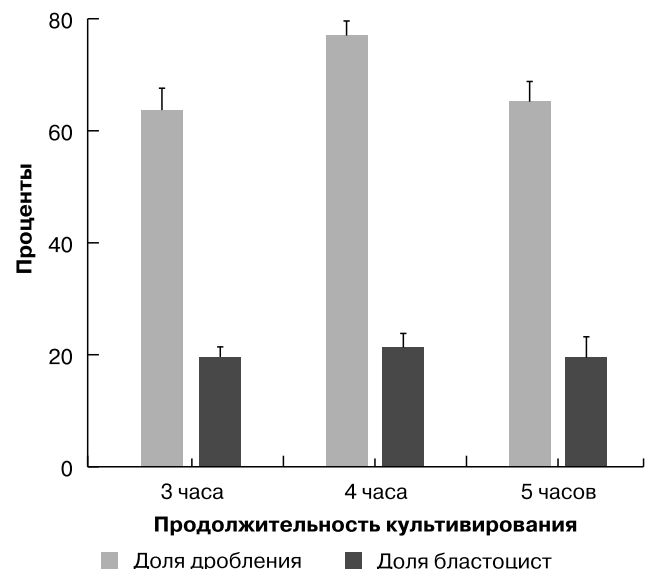


Рис. 1. Способность эмбрионов к развитию до стадии бластоцисты в зависимости от продолжительности воздействия 6-ДМАП (2мМ) и циклогексимида (10 мкг/мл) в пост-активационный период культивирования SCNT-ооцитов.

Примечание. Вертикальные отрезки — стандартные ошибки средних значений ($\pm$ SEM). Число независимых экспериментов $n=5$

ности культивирования до 4,0 и 5,0 ч не изменяло данный показатель ($21,3 \pm 2,5$ и $19,5 \pm 3,7\%$, соответственно).

Изучали также влияние времени культивирования в присутствии циклогексимида и 6-ДМАР на качество клонированных эмбрионов, которое оценивали по числу ядер и уровню апоптоза на 7-е сутки после активации (табл. 1). В случае воздействия ингибиторов в течение 3 ч число ядер в бластоцистах было 58,8. С увеличением продолжительности до 4 часов данный показатель возрастал до 76,6 ядра ($p < 0,05$), а более длительное воздействие (5 часов) ухудшало качество бластоцист ($p < 0,05$) по сравнению с 4-х часовым периодом. Тем не менее, доля ядер в эмбрионах с признаками апоптоза не различалась между экспери-

ментальными группами и варьировала от 5,4 до 7,0%. Полученные нами данные свидетельствуют о негативном влиянии 5-ти часового воздействия на полноценность клонированных эмбрионов, и что 3-х часовое воздействие в равной степени не обеспечивает формирования качественных бластоцист.

Выводы. Таким образом, нами подтверждено, что эффективность получения клонированных эмбрионов крупного рогатого скота предимплантационных стадий развития зависит от времени воздействия 6-ДМАР и циклогексимида на SCNT-ооциты в пост-активационный период их культивирования *in vitro*. Оптимальной продолжительностью применительно к описанному нами протоколу SCNT с точки зрения качества эмбрионов является 4 часа.

Таблица 1. Влияние продолжительности воздействия 6-ДМАР (2мМ) и циклогексимида (10 мкг/мл) в пост-активационный период культивирования цитогибридов на качество клонированных эмбрионов у крупного рогатого скота

Продолжительность культивирования	Число бластоцист	Число ядер в бластоцисте	
		всего	апоптотических, %
3 часа	15	$58,8 \pm 2,4^a$	$6,0 \pm 1,6$
4 часа	16	$76,6 \pm 1,4^b$	$5,4 \pm 1,5$
5 часов	15	$57,1 \pm 0,2^a$	$7,0 \pm 0,6$

Примечание. Число независимых экспериментов $n=5$. a, b $p < 0,05$ — достоверность различий между сравниваемыми группами.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования РФ.

Литература

1. Brophy B. Cloned transgenic cattle produce milk with higher levels of beta-casein and kappa-casein / B. Brophy, G. Smolenski, T. Wheeler, D. Wells, P. L'Huillier, G. Laible // *Nature Biotechnology*. — 2003. — Vol. 21. — P. 157–162. doi: 10.1038 / nbt783.
2. Richt J. A. Production of cattle lacking prion protein / J. A. Richt, P. Kasinathan, A. N. Hamir, J. Castilla et. al. // *Nature Biotechnology*. — 2007. — Vol. 25. — P. 132–138. doi: 10.1038 / nbt1271.
3. Wu H. TALE nickase-mediated SP110 knock in endows cattle with increased resistance to tuberculosis / H. Wu, Y. Wang, Y. Zhang, M. Yang, J. Lv, J. Liu, Y. Zhang // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. — 2015. — Vol. 112(13). — E1530–E1539. doi: 10.1073/pnas.1421587112.
4. Proudfoot C. Genome edited sheep and cattle / C. Proudfoot, D. F. Carlson, R. Huddart, C. R. Long, J. H. Pryor, T. J. King, S. G. Lillico, A. J. Mileham, D. J. McLaren, C. B. Whitelaw, S. C. Fahrenkrug // *Transgenic Research*. — 2015. — Vol. 24(1). — P. 147–153. doi: 10.1007 / s11248-014-9832-x.
5. Gao Y. Single Cas9 nickase induced generation of NRAMP1 knockin cattle with reduced off-target effects / Y. Gao, H. Wu, Y. Wang, X. Liu, L. Chen, Q. Li, C. Cui, X. Liu, J. Zhang, Y. Zhang // *Genome biology*. — 2017. — Vol. 18(1). — P. 13 doi:10.1186 / s13059-016-1144-4.
6. Farin P.W. Errors in development of fetuses and placentas from in vitro-produced bovine embryos / P. W. Farin, J. A. Piedrahita, C. E. Farin // *Theriogenology*. — 2006. — Vol. 65. — P. 178–191. doi: 10.1016/j.theriogenology.2005.09.022.
7. Bertolini M. Developmental problems during pregnancy after in vitro embryo manipulations / M. Bertolini, L. R. Bertolini, R. P. C. Gerger, C. A. Batchelder, G. B. Anderson // *Rev. Bras. Reprod. Anim.* — 2007. — Vol. 31. — P. 391–405.

8. Su J. Aberrant mRNA expression and DNA methylation levels of imprinted genes in cloned transgenic calves that died of large offspring syndrome / J. Su, Y. Wang, Q. Liu, B. Yang, Y. Wu, Y. Luo, G. Hu, Y. Zhang // *Livestock Science*. — 2011. — Vol. 141. — P. 24–35. doi: 10.1016/j.livsci.2011.04.012.
9. Latham K. E. Early and delayed aspects of nuclear reprogramming during cloning / K. E. Latham // *Biol. Cell*. — 2005. — Vol. 97. — P. 119–132. doi: 10.1042/BC20040068.
10. Milazzotto M. P. Effect of chemical or electrical activation of bovine oocytes on blastocyst development and quality / M. P. Milazzotto, W. B. Feitosa, A. R. S. Coutinho, M. D. Goissis et. al. // *Reprod. Dom. Anim.* — 2008. — Vol. 43. — P. 319–322. doi: 10.1111 / j.1439-0531.2007.00900.x.
11. Wakai T. Artificial activation of mammalian oocytes for cloning / T. Wakai, I. Ito, R.A. Fissore // *Principles of cloning*. — 2014. — P. 3–10. doi: 10.1016/B978-0-12-386541-0.00001-1.
12. Susko-Parrish J.L. Inhibition of protein kinases after an induced calcium transient causes transition of bovine oocytes to embryonic cycles without meiotic completion / J. L. Susko-Parrish, M. L. Leibfried-Rutledge, D. L. Northey, V. Schutzkus, N. L. First // *Dev Biol*. — 1994. — Vol. 166. — P. 729–739. doi: 10.1006/dbio.1994.1351.
13. 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*. — 2020. — Vol. 22(1). — P. 36–42. doi: 10.1089/cell.2019.0074.
14. Vichera G. Chemical activation with a combination of ionomycin and dehydroleucodine for production of parthenogenetic, ICSI and cloned bovine embryos / G. Vichera, J. Alfonso, C. C. Duque, M. A. Silvestre, F. Pereyra-Bonnet, R. Fernández-Martín and D. Salamone // *Reprod. Domest. Anim.* — 2010. — Vol. 45. — P. 306–312.
15. Akagi S. Recent progress in bovine somatic cell nuclear transfer / S. Akagi, M. Geshi, T. Nagai // *Animal Science Journal*. — 2013. Vol. 84(3). — P. 191–199. doi: 10.1111/asj.12035). 16.
16. Ross P. J. Bovine somatic cell nuclear transfer / P. J. Ross, J. B. Cibelli // *Cellular Programming and Reprogramming*. — 2010. — Vol. 636. — P. 155–177. doi: 10.1007/978-1-60761-691-7_10.
17. Bavister B.D. Development of preimplantation embryos of the golden hamster in a defined culture medium / B. D. Bavister, M. L. Liebfried, G. Lieberman // *Biology of Reproduction*. — 1993. — Vol. 28. — P. 235–247. doi: 10.1095/biolreprod28.1.235.
18. 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.
19. German S. D. Livestock somatic cell nuclear transfer. In: *Sustainable food production* / S. D. German, K. H. S. Campbell P. Christou, R. Savin, B. A. Costa-Pierce, I. Misztal, C. B. A. Whitelaw (eds.) Springer, New York. — 2013. — P. 1067–1095. doi: 10.1007/978-1-4614-5797-8_2.
20. Lan G. C. Effects of duration, concentration, and timing of ionomycin and 6-dimethylaminopurine (6-DMAP) treatment on activation of goat oocytes / G. C. Lan, D. Han, Y. G. Wu, Z. B. Han, S. F. Ma, X. Y. Liu, C.L. Chang, J. H. Tan // *Molecular Reproduction Development*. — 2005. — Vol. 71(3). — P. 380–8. doi: 10.1002/mrd.20267.

Shedova E., Lopukhov A.

Effect of duration of cycloheximide and 6-dimethylaminopurine (6-DMAP) treatments on development competence of cloned embryos in cattle

Abstract. Cycloheximide and 6-dimethylaminopurine (6-DMAP) are widely used in protocols of somatic cell nuclear transfer (SCNT) for inhibition of maturation promoting factor (MPF) activity in SCNT-oocytes in the post-activation period of their culture. Nevertheless, you should remember that these agents have a wide range of activity and can conflict with other cell processes. Therefore, a definition of the optimal period of culture of SCNT-oocytes with the previously mentioned inhibitors may help to prevent the undesirable negative consequences.

In this research the effects of cycloheximide (10 µg/ml) and 6-DMAP (2mM) treatments duration (3.0, 4.0 or 5.0 h) on the reprogramming of somatic nuclear was estimated by the cleavage and blastocyst rates, and by the total cell number and a level of apoptotic cell in the obtained cloned blastocysts. The cleavage rate did not differ between the experimental groups, varying from 63.7 to 77.0%. Also, there was not found an effect of treatment duration of the investigated factors on the development of activated SCNT-oocytes before blastocyst stage. For 3-hr treatment, the blastocyst rate was 19.6±1.8%. The prolonged up to 4 and 5 hours duration did not change this rate. Meanwhile, we found out the effect of culture duration with cycloheximide and 6-DMAP on quality of cloned embryos. In case of 3-hr treatment, the total cell number in cloned blastocyst was 58.8±2.4. With prolongation of duration up to 4 hours the result was growing up to 76.6±1.4 ($p<0.05$), but prolongation up to 5 hours reduced the total cell number in blastocyst as compared to that in 4-hr group ($p<0.05$). The apoptosis rate had no difference between the treated groups and had its variety between 5.4 to 7.0%. Our data indicate that efficiency of bovine cloned embryo production depends on duration of 6-DMAP and cycloheximide treatment of the SCNT-oocytes in the post-activated period of their culture. The optimal duration according to the described protocol of SCNT for the best quality of embryos is 4 hours.

Key words: cattle, somatic cell nuclear transfer, activation, embryo development.

Authors:

Shedova E. — researcher; e-mail: shedvek@yandex.ru;

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

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

References

1. Brophy B. Cloned transgenic cattle produce milk with higher levels of beta-casein and kappa-casein / B. Brophy, G. Smolenski, T. Wheeler, D. Wells, P. L'Huillier, G. Laible // *Nature Biotechnology*. — 2003. — Vol. 21. — P. 157–162. doi: 10.1038 / nbt783.
2. Richt J. A. Production of cattle lacking prion protein / J. A. Richt, P. Kasinathan, A. N. Hamir, J. Castilla et. al. // *Nature Biotechnology*. — 2007. — Vol. 25. — P. 132–138. doi: 10.1038 / nbt1271.
3. Wu H. TALE nickase-mediated SP110 knock in endows cattle with increased resistance to tuberculosis / H. Wu, Y. Wang, Y. Zhang, M. Yang, J. Lv, J. Liu, Y. Zhang // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. — 2015. — Vol. 112(13). — E1530–E1539. doi: 10.1073/pnas.1421587112.
4. Proudfoot C. Genome edited sheep and cattle / C. Proudfoot, D. F. Carlson, R. Huddart, C. R. Long, J. H. Pryor, T. J. King, S. G. Lillico, A. J. Mileham, D. J. McLaren, C. B. Whitelaw, S. C. Fahrenkrug // *Transgenic Research*. — 2015. — Vol. 24(1). — P. 147–153. doi: 10.1007 / s11248-014-9832-x.
5. Gao Y. Single Cas9 nickase induced generation of NRAMP1 knockin cattle with reduced off-target effects / Y. Gao, H. Wu, Y. Wang, X. Liu, L. Chen, Q. Li, C. Cui, X. Liu, J. Zhang, Y. Zhang // *Genome biology*. — 2017. — Vol. 18(1). — P. 13 doi:10.1186 / s13059-016-1144-4.
6. Farin P.W. Errors in development of fetuses and placentas from in vitro-produced bovine embryos / P. W. Farin, J. A. Piedrahita, C. E. Farin // *Theriogenology*. — 2006. — Vol. 65. — P. 178–191. doi: 10.1016/j.theriogenology.2005.09.022.
7. Bertolini M. Developmental problems during pregnancy after in vitro embryo manipulations / M. Bertolini, L. R. Bertolini, R. P. C. Gerger, C. A. Batchelder, G. B. Anderson // *Rev. Bras. Reprod. Anim.* — 2007. — Vol. 31. — P. 391–405.
8. Su J. Aberrant mRNA expression and DNA methylation levels of imprinted genes in cloned transgenic calves that died of large offspring syndrome / J. Su, Y. Wang, Q. Liu, B. Yang, Y. Wu, Y. Luo, G. Hu, Y. Zhang // *Livestock Science*. — 2011. — Vol. 141. — P. 24–35. doi: 10.1016/j.livsci.2011.04.012.
9. Latham K. E. Early and delayed aspects of nuclear reprogramming during cloning / K. E. Latham // *Biol. Cell*. — 2005. — Vol. 97. — P. 119–132. doi: 10.1042/BC20040068.
10. Milazzotto M. P. Effect of chemical or electrical activation of bovine oocytes on blastocyst development and quality / M. P. Milazzotto, W. B. Feitosa, A. R. S. Coutinho, M. D. Goissis et. al. // *Reprod. Dom. Anim.* — 2008. — Vol. 43. — P. 319–322. doi: 10.1111 / j.1439-0531.2007.00900.x.
11. Wakai T. Artificial activation of mammalian oocytes for cloning / T. Wakai, I. Ito, R. A. Fissore // *Principles of cloning*. — 2014. — P. 3–10. doi: 10.1016/B978-0-12-386541-0.00001-1.

12. Susko-Parrish J.L. Inhibition of protein kinases after an induced calcium transient causes transition of bovine oocytes to embryonic cycles without meiotic completion / J. L. Susko-Parrish, M. L. Leibfried-Rutledge, D. L. Northey, V. Schutzkus, N. L. First // *Dev Biol.* — 1994. — Vol. 166. — P. 729–739. doi: 10.1006/dbio.1994.1351.
13. 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.* — 2020. — Vol. 22(1). — P. 36–42. doi: 10.1089/cell.2019.0074.
14. Vichera G. Chemical activation with a combination of ionomycin and dehydroleucodine for production of parthenogenetic, ICSI and cloned bovine embryos / G. Vichera, J. Alfonso, C. C. Duque, M. A. Silvestre, F. Pereyra-Bonnet, R. Fernández-Martín and D. Salamone // *Reprod. Domest. Anim.* — 2010. — Vol. 45. — P. 306–312.
15. Akagi S. Recent progress in bovine somatic cell nuclear transfer / S. Akagi, M. Geshi, T. Nagai // *Animal Science Journal.* — 2013. Vol. 84(3). — P. 191–199. doi: 10.1111/asj.12035). 16.
16. Ross P. J. Bovine somatic cell nuclear transfer / P. J. Ross, J. B. Cibelli // *Cellular Programming and Reprogramming.* — 2010. — Vol. 636. — P. 155–177. doi: 10.1007/978-1-60761-691-7_10.
17. Bavister B.D. Development of preimplantation embryos of the golden hamster in a defined culture medium / B. D. Bavister, M. L. Liebfried, G. Lieberman // *Biology of Reproduction.* — 1993. — Vol. 28. — P. 235–247. doi: 10.1095/biolreprod28.1.235.
18. 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.
19. German S. D. Livestock somatic cell nuclear transfer. In: Sustainable food production / S. D. German, K. H. S. Campbell P. Christou, R. Savin, B. A. Costa-Pierce, I. Misztal, C. B. A. Whitelaw (eds.) Springer, New York. — 2013. — P. 1067–1095. doi: 10.1007/978-1-4614-5797-8_2.
20. Lan G. C. Effects of duration, concentration, and timing of ionomycin and 6-dimethylaminopurine (6-DMAP) treatment on activation of goat oocytes / G. C. Lan, D. Han, Y. G. Wu, Z. B. Han, S. F. Ma, X. Y. Liu, C.L. Chang, J. H. Tan // *Molecular Reproduction Development.* — 2005. — Vol. 71(3). — P. 380–8. doi: 10.1002/mrd.20267.