

Е. Н. Шедова, Е. В. Цындрина

## Получение культуры соматических клеток с использованием тканевого материала уха погибшего гибрида овцы и снежного барана

### Аннотация.

Получение и криоконсервация соматических клеток (СК) от ценных и исчезающих животных позволяет сохранить их генетический потенциал, а также обеспечить их репродукцию в будущем.

**Цель данной работы** состояла в попытке выделить СК из ткани уха погибшего уникального гибрида домашней овцы (*Ovis aries*) и снежного барана (*Ovis nivicola borealis*), сравнивая два различных метода обработки ткани: ферментативный и механический.

**Материалы и методы.** Материал (уши) получен от животного через 12 часов после его гибели на пастбище, доставлен в лабораторию и тщательно промыт от грязи под проточной водой. С части ушной раковины лезвием удаляли волосяной покров, кожу обрабатывали 70 % этиловым спиртом, после чего ткань трижды промывали в физиологическом растворе с антибиотиками и измельчали. Кусочки ткани многократно отмывали в фосфатно-солевом буфере и делили на две части. Одна часть ткани была сразу перенесена в среду культивирования (группа 1: кусочки уха без ферментативной обработки), оставшаяся предварительно подвергалась обработке 0,25 % раствором трипсина/ЭДТА. После трипсинизации использовались либо кусочки ткани (группа 2: кусочки уха с ферментативной обработкой), либо клеточные комплексы, выделенные из суспензионной фракции (группа 3: клеточные комплексы). Контроль формирования и роста культуры проводился ежедневно.

**Результаты.** В группе 3 с использованием клеточных комплексов, выделенных из кусочков уха в результате трипсинизации, колонии клеток формировались уже на 2 день культивирования. Из кусочков ткани (группа 1 и 2), вне зависимости от способа их обработки, рост клеток начинался через пять дней. На девятый день культивирования от всех групп была получена первичная культура, представленная двумя типами СК. В целом, единичные клеточные комплексы (группа 3) быстрее формировали в культуре зоны роста, но конечные результаты получения культуры СК и их морфологические особенности не отличались от групп 1 и 2, когда кусочки ткани использовались без и после трипсинизации целиком.

**Заключение.** Таким образом, нами показана возможность выделения культуры СК из ткани уха гибрида овцы и снежного барана, которая была получена через 12 часов после гибели животного.

**Ключевые слова:** гибрид овцы и снежного барана, культура соматических клеток.

Авторы:

Шедова Е. Н. – научный сотрудник; e-mail: shedvek@yandex.ru;

Цындрина Е. В. – младший научный сотрудник; e-mail: kiril04kina@yandex.ru.

Федеральный исследовательский центр животноводства – ВИЖ имени академика Л. К. Эрнста; 142132, Россия, Московская область, городской округ Подольск, поселок Дубровицы, д. 60.

**Введение.** Криоконсервирование клеток сельскохозяйственных животных, таких как сперма, яйцеклетки и эмбрионы, широко используется в программах сохранения и улучшения генетических ресурсов домашних животных [1, 2]. Открытие феномена репрограммирования ядер соматических клеток позволило расширить спектр форм биоматериала в программах по

криоконсервации [3, 4]. Создание криобанков соматических клеток (СК) – доноров ядер для клонирования, является альтернативным вариантом поддержания генетического разнообразия у сельскохозяйственных животных, а также диких животных, находящихся под угрозой исчезновения [5, 6].

В настоящее время получено клонированное

потомства более чем у 20 видов животных, в том числе сельскохозяйственных, включая домашнюю овцу, корову, свинью и лошадь [7]. Кроме того, на практике клонирование ядер соматических клеток (somatic cell nuclear transfer, SCNT) используется для тиражирования уникальных генотипов у крупного рогатого скота [8] и ряда других домашних животных [9, 10, 11, 12], а также размножения уникальных межвидовых гибридов (в том числе бесплодных) с выгодными генотипами (техасский лонгхорн [13] и гоночный мул [14]). Есть также примеры сохранения исчезающих видов с применением SCNT, в частности дикого быка *Bos gaurus* [15], находящегося под угрозой исчезновения муфлона (*Ovis orientalis musimon*) и вымершего подвиды дикого козла (*Capra pyrenaica pyrenaica*) [16].

Для создания жизнеспособных криоконсервированных клеточных культур достаточно небольшого количества биопсийного материала, при этом такие линии содержат полный геном и протеом. В отличие от половых клеток и эмбрионов, а также от генеративных тканей криоконсервированные СК после многократного размораживания способны к регенерации, то есть могут практически бесконечно служить источником биоматериала как для использования во вспомогательных репродуктивных технологиях, так и для биологических исследований [17, 18]. Кроме того, СК могут быть единственным источником генетического ресурса в тех случаях, когда нет возможности осуществить сбор жизнеспособных гамет, в том числе у особей, умерших неожиданно, до наступления половой зрелости или вне сезона размножения [19].

СК могут быть выделены практически из любого типа ткани, но предпочтительными считаются фетальные фибробласты, выделенные из плодов животных. Данный тип клеток характеризуется низким уровнем мутаций и высокой пролиферативной активностью [20]. Однако при создании банка соматических клеток для сохранения генетических ресурсов животных, а также в селекционных программах не всегда есть возможность получения фетального материала, тогда источником СК (фибробластов) служит биоматериал от конкретного животного. Фибробласты, в таком случае, получают чаще всего из кожи, мышц и хрящевой ткани [21].

В независимости от типа исходной ткани для выделения первичной культуры используют два основных подхода: метод прямого эксплантата и ферментативный метод [22]. Метод эксплантации может собирать менее гетерогенные клеточ-

ные популяции, которые демонстрируют более высокую скорость пролиферации и жизнеспособность клеток, чем ферментативный метод.

Исходная ткань промывается для удаления клеток крови, а затем механически измельчается, путем разрезания на мелкие кусочки длиной не более нескольких миллиметров. Затем кусочки ткани помещают на культуральный пластик для культивирования с питательной средой. Через несколько дней кусочки ткани можно удалить [23]. При ферментативном подходе ткань также механически измельчается и дополнительно обрабатывается дезагрегирующим раствором (трипсин, коллагеназа и т.д.), который разрушает внеклеточный матрикс. Полученные отдельные клетки или небольшие клеточные агрегаты переносятся в чашки с питательной средой для дальнейшего культивирования. [24]. Выбор того или иного метода определяется типом ткани и тем, какие клетки мы хотим получить.

Возможны случаи, когда уникальное животное погибло, а от него так и не были получены соматические клетки. В такой ситуации возникает вопрос о методе и временном интервале, при котором возможно получить жизнеспособные СК от мертвого животного [25, 26]. На сегодняшний день в литературе упоминаются единичные случаи успешного выделения первичных фибробластов из кожи погибших в естественных условиях особей: азиатского слона (*Elephas maximus*) [27] и китайского мунтжака (*Muntiacus reevesi*) [28].

**Цель нашей работы** состояла в попытке выделить СК из ткани уха уникального гибрида овцы (*Ovis aries*) и снежного барана (*Ovis nivicola borealis*), сравнивая два различных метода обработки ткани: ферментативный и механический. Данное животное погибло в летнее время за 12 часов до отбора у него исходного тканевого материала.

**Материалы и методы.** Материал (уши) был получен от животного непосредственно на месте его гибели (пастбище), доставлен в лабораторию в естественном виде и тщательно промыт от грязи под проточной водой. С части ушной раковины лезвием удаляли волосяной покров, кожу обрабатывали 70% этиловым спиртом, после чего ткань трижды промывали в физиологическом растворе с антибиотиками (200 МЕ/мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина). Обработанный таким образом материал разрезали скальпелем на мелкие кусочки и промывали (многократно) в фосфатно-солевом буфере (ФБС), содержащем 100 МЕ/мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина и 25 нг/мл амфотерицина Б.

Согласно схеме эксперимента, для дальнейшей работы измельченный и промытый тканевой материал был разделен примерно на две равные порции, каждая из которых была перенесена в пробирку объемом 15 мл. К первой пробирке было добавлено 8 мл среды DMEM (Gibco, США, кат. № 31966021) с 5 % фетальной бычьей сыворотки (ФБС) и 50 мкг/мл гентамицина (DMEM-1), после чего проведено центрифугирование при 2000 об/мин в течение 7 мин. Супернатант удаляли, осадок ресуспендировали в 8 мл среды DMEM-1, повторно центрифугировали, и кусочки ткани высеивали в культуральные флаконы (TPP, Швейцария, кат. № 90076) с 12-15 мл ростовой средой DMEM (Gibco, США, кат. № 31966021), дополненной 15 % ФБС, 1 % несущественных аминокислот (MEM non-essential Amino Acid) и 50 мкг/мл гентамицина (DMEM-2) для культивирования. Оставшаяся часть тканевого материала была подвергнута обработке 4 мл 0,25 % раствором трипсина/ЭДТА при 37 °C. Через 20 мин обработки жидкую фракцию и измельченную ткань помещали раздельно в новые пробирки, добавляли в каждую по 8 мл среды DMEM-1, для нейтрализации трипсина и центрифугировали 7 мин при 2000 об/мин. Полученный осадок с кусочками ткани или клеток переносили в культуральные флаконы (TPP, Швейцария, кат. № 90076) для культивирования, как описано выше.

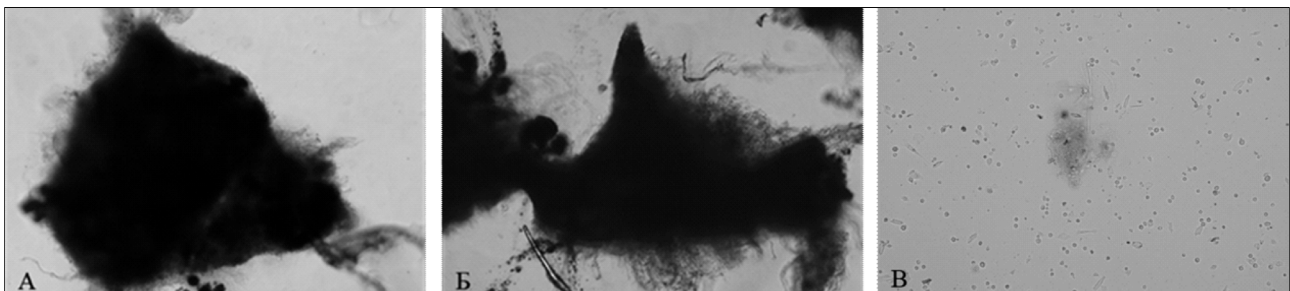
Флаконы с различными вариантами обработки тканевого материала культивировали в условиях инкубатора при 38,5 °C, 5 % CO<sub>2</sub> в воздухе и максимальной влажности с использованием среды DMEM-2. Раз в три дня проводили замену данной среды. Контроль формирования и роста культуры проводился ежедневно с использованием инвертированного микроскопа Eclipse Ti-U (Nikon, Япония).

Первичную культуру пересеивали в новые флаконы. Ростковую среду заменяли раствором трипсина/ЭДТА, флаконы инкубировали в термостате при 37 °C, после чего суспензию клеток перено-

сили в центрифужные пробирки, содержащие DMEM-1, для нейтрализации трипсина и осаждали центрифугированием при 1500 об/мин в течение 5 мин. Супернатант удаляли, осадок ресуспендировали и вновь культивировали с ростовой средой DMEM-2 (каждую группу отдельно). После формирования монослоя клетки вновь снимали с поверхности культурального флакона, как описано выше, после чего использовали для замораживания.

**Результаты и обсуждение.** В данном исследовании оценивали необходимость в ферментативной обработке тканевого материала уха для эффективного получения из него первичной культуры СК. Также сравнивали результативность получения культуры либо из целых кусочков ткани, либо из выделенных из них клеток. Для этого механически измельченная ткань уха перед помещением в среду культивирования подвергалась ферментативной обработке 0,25 % раствором трипсин/ЭДТА (группа 2: кусочки с ферментативной обработкой, рис. 1Б). В качестве альтернативного варианта ткань уха переносилась в среду для роста только после механического измельчения без обработки дезагрегирующим раствором (группа 1: кусочки без ферментативной обработки, рис. 1А). Дополнительно для культивирования использовали отдельные клетки и клеточные комплексы, выделенные из жидкой фракции после трипсинизации (группа 3: клеточные комплексы рис. 1 В).

Результаты морфологической оценки состояния кусочков ткани в культуре показали, что в независимости от способа их обработки (с или без использования трипсин/ЭДТА) единичные закрепившиеся на культуральном пластике кусочки ткани, образовавшие центры роста клеток, наблюдались через пять дней культивирования (рис. 2 А, Б). В группе с использованием выделенных из кусочков уха в результате трипсинизации клеточных комплексов зоны роста клеток формировались уже на 2-й день культивирова-



**Рис. 1.** Микрофотографии кусочков ткани уха без (А) и с (Б) ферментативной обработкой, а также клеточных комплексов (В) после переноса их в ростовую среду и до начала культивирования.

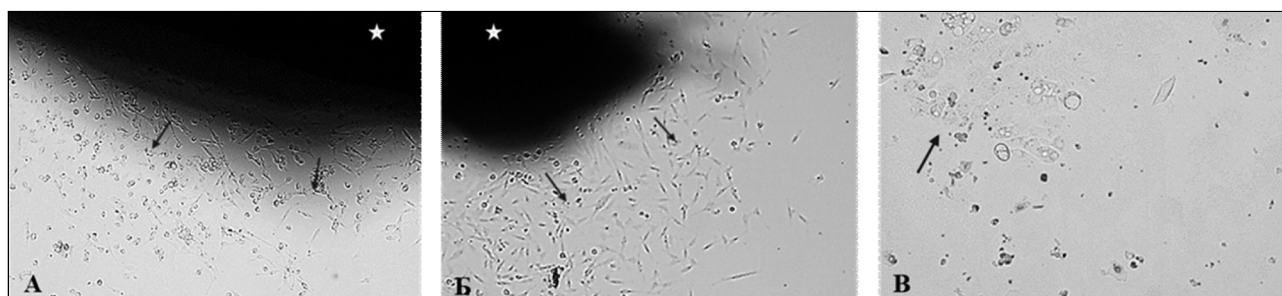
Примечание – инвертированный микроскоп Eclipse Ti-U (Nikon, Япония). Увеличение x100.

ния (рис. 2 В). Через девять дней культивирования во всех группах была получена первичная культура, сформированная из двух типов СК. Большая часть выделенных клеток представляет собой участки фибробластоподобных клеток, но встречаются также зоны эпителиальных клеток (рис. 3 А-В).

В целом единичные клеточные комплексы быстрее формировали зоны роста, но конечные результаты получения культуры СК и их морфологические особенности не отличались от вариантов, когда кусочки ткани использовались без и после трипсинизации целиком. Сходный характер роста во всех группах наблюдался и

после посева первичной культуры. Следует отметить, что на протяжении всего периода культивирования во флаконах с культурой как отдельных кусочков, так и клеточных комплексов признаков контаминации обнаружено не было.

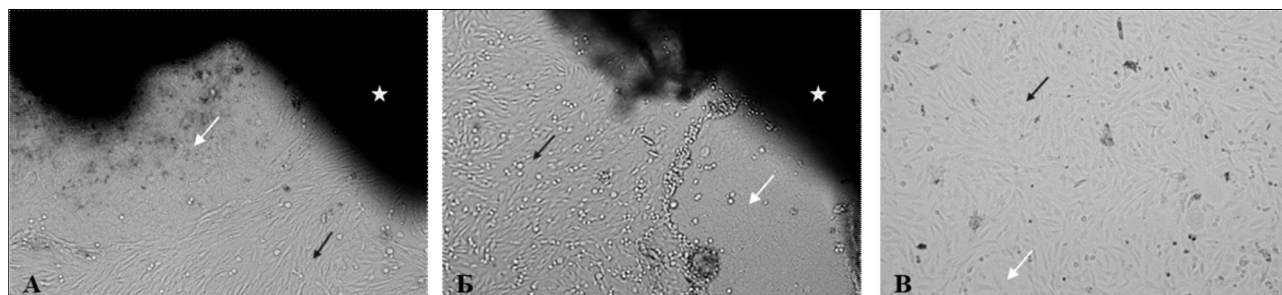
**Заключение.** Таким образом, ухо погибшего гибрида овцы и снежного барана (12 часов до момента забора ткани) может быть использовано для выделения СК. При этом получить культуру возможно без предварительной ферментативной обработки ткани, а в случае использования последней источником могут служить как целые кусочки ткани, так и выделенные из них клеточные комплексы.



**Рис. 2.** Появление первичных зон роста СК в культуре при различных способах обработки ткани уха гибрида овцы и снежного барана.

Примечания:

- (А) кусочки ткани уха без ферментативной обработки (5-й день культивирования); - (Б) кусочки ткани уха с ферментативной обработкой (5-й день культивирования); - (В) клеточные комплексы, выделенные из кусочков ткани уха после трипсинизации (2-й день культивирования). Стрелками указаны зоны роста;
- Белыми звездочками, выделены кусочки ткани уха (темные пятна на фотографии). Инвертированный микроскоп Eclipse Ti-U (Nikon, Япония): [А, Б] увеличение x100; [В] увеличение x200.



**Рис. 3.** Формирование первичной культуры СК при различных способах обработки ткани уха гибрида овцы и снежного барана.

Примечания:

- (А) кусочки ткани уха без ферментативной обработки; - (Б) кусочки ткани уха с ферментативной обработкой; - (В) клеточные комплексы, выделенные из кусочков ткани уха после трипсинизации; - 9-й день культивирования (инвертированный микроскоп Eclipse Ti-U (Nikon, Япония), увеличение x100).
- Белыми звездочками, выделены кусочки ткани уха (темные пятна на фотографии);
- черной стрелкой указана культура фибробластоподобных клеток и белой эпителиальных клеток.

*Работа выполнена при финансовой поддержке  
Министерства науки и высшего образования РФ (ГЗ № 0445-2021-0004).*

### Литература

1. Boettcher P.J. The combined use of embryos and semen for cryogenic conservation of mammalian livestock genetic resources / P.J. Boettcher, A. Stella, F. Pizzi, G. Gandini // Gen. Select. Evol. — 2005. — V. 37(6). — P. 657-675. doi: 10.1186/1297-9686-37-7-657.
2. Pereira R.M. Animal oocyte and embryo cryopreservation / R.M. Pereira, C.C. Marques // Cell and Tissue Bank. — 2008. — V. 9(4). — P. 267-277. doi: 10.1007/s10561-008-9075-2.

3. Malin K. The many problems of somatic cell nuclear transfer in reproductive cloning of mammals / K. Malin, O. Witkowska-Piłaszewicz, K. Papis // *Theriogenology*. — 2022. — V. 189. — P. 246-254. doi.org/10.1016/j.theriogenology.2022.06.030.
4. Tian X.C. Cloning animals by somatic cell nuclear transfer-biological factors / X.C. Tian, C. Kubota, B. Enright, X. Yang // *Reprod. Biol. Endocrinol.* — 2003. — V. 13(1). — P. 98-106. doi: 10.1186/1477-7827-1-98.
5. Leon-Quinto T. Developing biological resource banks as a supporting tool for wildlife reproduction and conservation. The Iberian lynx bank as a model for other endangered species / T. Leon-Quinto, M.A. Simon, R. Cadenas, J. Jones et al. // *Anim. Reprod. Sci.* — 2009. — V. 112. — P. 347-361. doi: 10.1016/j.anireprosci.2008.05.070.
6. Holt W.V. Genome resource banking for wildlife conservation: promises and caveats / W.V. Holt, P. Comizzoli // *Cryo Letters*. — 2021. — V. 42(6). — P. 309-320.
7. Singina G.N. Cryobanking of somatic cells in conservation of animal genetic resources: prospects and successes / G.N. Singina, N.A. Volkova, V.A. Bagirov, N.A. Zinovieva // *Sel'skokhozyaistvennaya Biologiya [Agricultural Biology]*. — 2014. — №. 6. — P. 3-14. doi: 10.15389/agrobiology.2014.6.3eng.
8. Keefer C.L. Artificial cloning of domestic animals / C.L. Keefer // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. — 2015. — V. 112(29). — P. 8874-8. doi: 10.1073/pnas.1501718112.
9. Skrzyszowska M. Generating Cloned Goats by Somatic Cell Nuclear Transfer-Molecular Determinants and Application to Transgenics and Biomedicine / M. Skrzyszowska, M. Samiec // *Int. J. Mol. Sci.* — 2021. — V. 22(14). — P. 7490. doi: 10.3390/ijms22147490.
10. Van der Berg J.P. Regulation and safety considerations of somatic cell nuclear transfer-cloned farm animals and their offspring used for food production / J.P. Van der Berg, G.A. Kleter, E.J. Kok // *Theriogenology*. — 2019. — V. 135. — P. 85-93. doi: 10.1016/j.theriogenology.2019.06.001.
11. Lagutina I. Interspecies somatic cell nuclear transfer: advancements and problems / I. Lagutina., H. Fulka, G. Lazzari, C. Galli // *Cell. Reprogram.* — 2013. — V. 15(5). — P. 374-84. doi: 10.1089/cell.2013.0036.
12. Selokar N.L. Cloning of breeding buffalo bulls in India: Initiatives & challenges / N.L. Selokar // *Indian J. Med. Res.* — 2018. — V. 148 — P. 120-124. doi: 10.4103/ijmr.IJMR\_2103\_17.
13. Leford A. A breed apart / A. Leford // *Nature*. — 2006. — V. 444(7116). — P. 137. doi: 10.1038/444137a.
14. Woods G.L. A mule cloned from fetal cells by nuclear transfer / G.L. Woods, K.L. White, D.K. Vanderwall et al. // *Science*. — 2003. — V. 301(5636). — P. 1063. doi: 10.1126/science.1086743.
15. Lanza R.P. Cloning of an endangered species (*Bos gaurus*) using interspecies nuclear transfer / R.P. Lanza, J.B. Cibelli, F. Diaz et al. // *Cloning*. — 2000. — V. 2(2). — P. 79-90. doi: 10.1089/152045500436104.
16. Folch J. First birth of an animal from an extinct subspecies (*Capra pyrenaica pyrenaica*) by cloning / J. Folch, M.J. Cocero, P. Chesnř et al. // *Theriogenology*. — 2009. — V. 71(6). — P. 1026-34. doi: 10.1016/j.theriogenology.2008.11.005.
17. Ryder O.A. Viable Cell Culture Banking for Biodiversity Characterization and Conservation / O.A. Ryder, M. Onuma // *Annu. Rev. Anim. Biosci.* — 2018. — V. 6. — P. 83-98. doi: 10.1146/annurev-animal-030117-014556.
18. Lermen D. Cryobanking of viable biomaterials: implementation of new strategies for conservation purposes / D. Lermen, B. Blumeke, R. Browne et al. // *Mol. Ecol.* — 2009. — V. 18(6). — P. 1030-3. doi: 10.1111/j.1365-294X.2008.04062.x.
19. Sano M. A Simple Cryopreservation Method for Efficient Isolation of Live Cells from Dead Animals / M. Sano, A. Kawanabe, Y. Kurosawa et al. // *Mammal. Study*. — 2022. — V. 47(2). — P. 103-111. doi.org/10.3106/ms2021-0019.
20. Niemann H. Somatic cell nuclear transfer cloning: practical applications and current legislation / H. Niemann, A. Lucas-Hahn // *Reprod. Dom. Anim.* — 2012. — V. 47(5). — P. 2-10. doi: 10.1111/j.1439-0531.2012.02121.x.
21. Cetinkaya G. The value of frozen cartilage tissues without cryoprotection for genetic conservation / G. Cetinkaya, I. Hatipoglu, S. Arat // *Cryobiology*. — 2014. — V. 68(1). — P. 65-70. doi: 10.1016/j.cryobiol.2013.11.008.

22. Mushahary D. Isolation, cultivation, and characterization of human mesenchymal stem cells / D. Mushahary, A. Spittler, C. Kasper et al. // *Cytometry A*. — 2018. — V. 93(1). — P. 19-31. doi: 10.1002/cyto.a.23242.
23. Madelaire C.B. Fibroblasts as an experimental model system for the study of comparative physiology / C.B. Madelaire, A.C. Klink, W.J. Israelsen, A.G. Hindle // *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* — 2022. — V. 260. — P. 110735. doi: 10.1016/j.cbpb.2022.110735.
24. Abade Dos Santos F.A. Simple Method for Establishing Primary Leporidae Skin Fibroblast Cultures / F.A. Abade Dos Santos, C.L. Carvalho, I. Almeida et al. // *Cells*. — 2021. — V. 10(8). — P. 2100. doi: 10.3390/cells10082100.
25. Okonkwo C. Recovery of fibroblast-like cells from refrigerated goat skin up to 41 d of animal death / C. Okonkwo, M. Singh // *In Vitro Cell. Dev. Biol. Anim.* — 2015. — V. 51(5). — P. 463–469. doi: 10.1007/s11626-014-9856-9.
26. Singh M. Effect of postmortem time interval on in vitro culture potential of goat skin tissues stored at room temperature / M. Singh, X Ma, A. Sharma // *In Vitro Cell. Dev. Biol. Anim.* — 2012 — V. 48(8). — P. 478–482. doi: 10.1007/s11626-012-9539-3.
27. Siengdee P. Isolation and culture of primary adult skin fibroblasts from the Asian elephant (*Elephas maximus*) / P. Siengdee, S. Klinhom, C. Thitaram, K. Nganvongpanit // *PeerJ*. — 2018. — V. 6. — e4302. doi: 10.7717/peerj.4302.
28. Wang T. Establishment and characterization of a fibroblast cell line from postmortem skin of an adult Chinese muntjac (*Muntiacus reevesi*) / T. Wang, Z. Li, D. Zheng et al. // *In Vitro Cell. Dev. Biol. Animal*. — 2020. — V. 56. — P. 97–102. doi.org/10.1007/s11626-019-00422-8.

---

Shedova E., Tsyndrina E.

## Obtaining a culture of somatic cells using tissue material from the ear of dead sheep/snow sheep hybrid

### Abstract.

*Production and cryopreservation of somatic cells (SCs) from valuable and endangered animals allows a preservation of genetic diversity and ensuring their future reproduction. The aim of present work was to isolate SCs from the ear of unique hybrid sheep (*Ovis aries*) and snow sheep (*Ovis nivicola borealis*) post-mortem. In this purpose, enzymatic and mechanical methods of tissue preparation were compared.*

**Materials and Methods.** Ears from deceased animal were brought to the laboratory 12 hours after the death in a pasture, and biological material was thoroughly washed under running water. The hairs were removed from the part of the ear shell by the blade. Skin fragments were treated with 70% ethyl alcohol, washed three times in a saline solution with antibiotics and ground up to small pieces. The ear pieces were washed several times in phosphate buffer saline and divided into two parts. One part of the explants started in vitro culture without enzymatic treatment (group 1), whereas another part was pre-treated with a 0.25% trypsin/EDTA solution. After trypsinization, either tissue fragments (group 2), or cell complexes separated from cell suspension fraction (group 3) were taken for in vitro culture for 9 days. Monitoring of cell colony formation and growth was carried out daily.

**Results.** In the group 3, cell colonies were formed on the second day of in vitro culture. In groups 1 and 2, cell growth was observed from tissue fragments after five days regardless of the treatment. On the 9th day, all the groups produced the primary cultures, represented by two types of SCs. In general, single cell complexes from the group 3 formed cell growth zones more quickly than tissue explants from the groups 1 and 2, however, final cultures of SCs and their morphological aspects were no different between the groups.

**Conclusion.** Methodological protocols were proposed and successfully used to obtain in vitro cultures of SCs from the ear of dead sheep/snow sheep hybrid animal, 12 hours post-mortem that may allow further storage of valuable genetic material.

**Key words:** *ssheep/snow sheep hybrid animal; somatic cell culture.*

**Authors:**

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

**Tsyndrina E.** — junior researcher; e-mail: kiril04kina@yandex.ru.

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

## References

1. Boettcher P.J. The combined use of embryos and semen for cryogenic conservation of mammalian livestock genetic resources / P.J. Boettcher, A. Stella, F. Pizzi, G. Gandini // *Gen. Select. Evol.* — 2005. — V. 37(6). — P. 657-675. doi: 10.1186/1297-9686-37-7-657.
2. Pereira R.M. Animal oocyte and embryo cryopreservation / R.M. Pereira, C.C. Marques // *Cell and Tissue Bank.* — 2008. — V. 9(4). — P. 267-277. doi: 10.1007/s10561-008-9075-2.
3. Malin K. The many problems of somatic cell nuclear transfer in reproductive cloning of mammals / K. Malin, O. Witkowska-Piłaszewicz, K. Papis // *Theriogenology.* — 2022. — V. 189. — P. 246-254. doi.org/10.1016/j.theriogenology.2022.06.030.
4. Tian X.C. Cloning animals by somatic cell nuclear transfer-biological factors / X.C. Tian, C. Kubota, B. Enright, X. Yang // *Reprod. Biol. Endocrinol.* — 2003. — V. 13(1). — P. 98-106. doi: 10.1186/1477-7827-1-98.
5. Leon-Quinto T. Developing biological resource banks as a supporting tool for wildlife reproduction and conservation. The Iberian lynx bank as a model for other endangered species / T. Leon-Quinto, M.A. Simon, R. Cadenas, J. Jones et al. // *Anim. Reprod. Sci.* — 2009. — V. 112. — P. 347-361. doi: 10.1016/j.anireprosci.2008.05.070.
6. Holt W.V. Genome resource banking for wildlife conservation: promises and caveats / W.V. Holt, P. Comizzoli // *Cryo Letters.* — 2021. — V. 42(6). — P. 309-320.
7. Singina G.N. Cryobanking of somatic cells in conservation of animal genetic resources: prospects and successes / G.N. Singina, N.A. Volkova, V.A. Bagirov, N.A. Zinovieva // *Sel'skokhozyaistvennaya Biologiya [Agricultural Biology].* — 2014. — №. 6. — P. 3-14. doi: 10.15389/agrobiology.2014.6.3eng.
8. Keefer C.L. Artificial cloning of domestic animals / C.L. Keefer // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* — 2015. — V. 112(29). — P. 8874-8. doi: 10.1073/pnas.1501718112.
9. Skrzyszowska M. Generating Cloned Goats by Somatic Cell Nuclear Transfer-Molecular Determinants and Application to Transgenics and Biomedicine / M. Skrzyszowska, M. Samiec // *Int. J. Mol. Sci.* — 2021. — V. 22(14). — P. 7490. doi: 10.3390/ijms22147490.
10. Van der Berg J.P. Regulation and safety considerations of somatic cell nuclear transfer-cloned farm animals and their offspring used for food production / J.P. Van der Berg, G.A. Kleter, E.J. Kok // *Theriogenology.* — 2019. — V. 135. — P. 85-93. doi: 10.1016/j.theriogenology.2019.06.001.
11. Lagutina I. Interspecies somatic cell nuclear transfer: advancements and problems / I. Lagutina., H. Fulka, G. Lazzari, C. Galli // *Cell. Reprogram.* — 2013. — V. 15(5). — P. 374-84. doi: 10.1089/cell.2013.0036.
12. Selokar N.L. Cloning of breeding buffalo bulls in India: Initiatives & challenges / N.L. Selokar // *Indian J. Med. Res.* — 2018. — V. 148 — P. 120-124. doi: 10.4103/ijmr.IJMR\_2103\_17.
13. Leford A. A breed apart / A. Leford // *Nature.* — 2006. — V. 444(7116). — P. 137. doi: 10.1038/444137a.
14. Woods G.L. A mule cloned from fetal cells by nuclear transfer / G.L. Woods, K.L. White, D.K. Vanderwall et al. // *Science.* — 2003. — V. 301(5636). — P. 1063. doi: 10.1126/science.1086743.
15. Lanza R.P. Cloning of an endangered species (*Bos gaurus*) using interspecies nuclear transfer / R.P. Lanza, J.B. Cibelli, F. Diaz et al. // *Cloning.* — 2000. — V. 2(2). — P. 79-90. doi: 10.1089/152045500436104.
16. Folch J. First birth of an animal from an extinct subspecies (*Capra pyrenaica pyrenaica*) by cloning /

- J. Folch, M.J. Cocero, P. Chesnй et al. // *Theriogenology*. – 2009. – V. 71(6). – P. 1026-34. doi: 10.1016/j.theriogenology.2008.11.005.
17. Ryder O.A. Viable Cell Culture Banking for Biodiversity Characterization and Conservation / O.A. Ryder, M. Onuma // *Annu. Rev. Anim. Biosci.* – 2018. – V. 6. – P. 83-98. doi: 10.1146/annurev-animal-030117-014556.
18. Lermen D. Cryobanking of viable biomaterials: implementation of new strategies for conservation purposes / D. Lermen, B. Влцмеке, R. Browne et al. // *Mol. Ecol.* – 2009. – V. 18(6). – P. 1030-3. doi: 10.1111/j.1365-294X.2008.04062.x.
19. Sano M. A Simple Cryopreservation Method for Efficient Isolation of Live Cells from Dead Animals / M. Sano, A. Kawanabe, Y. Kurosawa et al. // *Mammal. Study.* – 2022. – V. 47(2). – P. 103-111. doi.org/10.3106/ms2021-0019.
20. Niemann H. Somatic cell nuclear transfer cloning: practical applications and current legislation / H. Niemann, A. Lucas-Hahn // *Reprod. Dom. Anim.* – 2012. – V. 47(5). – P. 2-10. doi: 10.1111/j.1439-0531.2012.02121.x.
21. Cetinkaya G. The value of frozen cartilage tissues without cryoprotection for genetic conservation / G. Cetinkaya, I. Hatipoglu, S. Arat // *Cryobiology.* – 2014. – V. 68(1). – P. 65-70. doi: 10.1016/j.cryobiol.2013.11.008.
22. Mushahary D. Isolation, cultivation, and characterization of human mesenchymal stem cells / D. Mushahary, A. Spittler, C. Kasper et al. // *Cytometry A.* – 2018. – V. 93(1). – P. 19-31. doi: 10.1002/cyto.a.23242.
23. Madelaire C.B. Fibroblasts as an experimental model system for the study of comparative physiology / C.B. Madelaire, A.C. Klink, W.J. Israelsen, A.G. Hindle // *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* – 2022. – V. 260. – P. 110735. doi: 10.1016/j.cbpb.2022.110735.
24. Abade Dos Santos F.A. Simple Method for Establishing Primary Leporidae Skin Fibroblast Cultures / F.A. Abade Dos Santos, C.L. Carvalho, I. Almeida et al. // *Cells.* – 2021. – V. 10(8). – P. 2100. doi: 10.3390/cells10082100.
25. Okonkwo C. Recovery of fibroblast-like cells from refrigerated goat skin up to 41 d of animal death / C. Okonkwo, M. Singh // *In Vitro Cell. Dev. Biol. Anim.* – 2015. – V. 51(5). – P. 463–4691. doi: 10.1007/s11626-014-9856-9.
26. Singh M. Effect of postmortem time interval on in vitro culture potential of goat skin tissues stored at room temperature / M. Singh, X Ma, A. Sharma // *In Vitro Cell. Dev. Biol. Anim.* – 2012 – V. 48(8). – P. 478–482. doi: 10.1007/s11626-012-9539-3.
27. Siengdee P. Isolation and culture of primary adult skin fibroblasts from the Asian elephant (*Elephas maximus*) / P. Siengdee, S. Klinhom, C. Thitaram, K. Nganvongpanit // *PeerJ.* – 2018. – V. 6. – e4302. doi: 10.7717/peerj.4302.
28. Wang T. Establishment and characterization of a fibroblast cell line from postmortem skin of an adult Chinese muntjac (*Muntiacus reevesi*) / T. Wang, Z. Li, D. Zheng et al. // *In Vitro Cell. Dev. Biol. Animal.* – 2020. – V. 56. – P. 97–102. doi.org/10.1007/s11626-019-00422-8.