

## Биология развития

doi.org/10.31043/2410-2733-2024-3-98-106  
УДК 636.32/.38:591.39:576.5

А. С. Жукова, А. В. Лопухов, Е. Н. Шедова, Г. Н. Сингина

### Эффективность соматического клонирования овец в зависимости от условий слияния и подготовки кариопластов

#### Аннотация.

**Целью** данного исследования было оценить влияние кратности электрослияния на результативность клонирования у овец и зависимость данного влияния от продолжительности сывороточного голодания соматических клеток.

**Материалы и методы.** В качестве донорских клеток при проведении соматического клонирования была использована культура фетальных фибробластов IV-V пассажа. С целью остановки СК в фазе G0/G1 цикла при достижении ими монослоя с конфлюэнтностью, близкой к 90 %, продолжали культивирование в условиях сывороточного голодания (СГ) в течение 24 и 48 часов. Ооциты-реципиенты выделены из яичников овец, полученных *post-mortem*, созревали *in vitro* и были реконструированы путем энуклеации и переноса в перивителлиновое пространство СК. Способом объединения комплексов ооцит/СК являлось электрослияние – применение двух последовательных импульсов постоянного тока напряжением 40 В и продолжительностью 20 мкс в буфере, содержащем 270 мМ маннитола. Неслившиеся после первого воздействия комплексы подвергали повторному слиянию. Полученные цитогибриды активировали иономицином с последующей 4-х часовой инкубацией в присутствии 6-диметиламинопурина и циклогексимида, а затем культивировали в течение 48 часов с целью эмбрионального развития.

**Результаты.** В ходе проведения данного исследования было реконструировано 504 ооцита. Обнаружено статистически значимое более высокое количество раздробившихся цитогбридов, полученных от первого слияния, при использовании в качестве кариопластов фетальных фибробластов, подвергавшихся 48-часовому СГ. Количество эмбрионов, полученных при повторном слиянии, не зависело от продолжительности СГ соматических клеток. При применении СК, подвергавшихся 48-часовому СГ, обнаруживаются статистически значимые различия между долей раздробившихся цитогбридов, полученных при первом и повторном слиянии:  $62,2 \pm 21,48$  % и  $31,4 \pm 26,43$  %, соответственно ( $p=0,010$ ). Доля раздробившихся цитогбридов, полученных в ходе повторного слияния, составляет 35,2 % и 28,6 % от общего числа клонированных эмбрионов при 24- и 48-часовом СГ, соответственно, что вносит существенный вклад в общее число полученных эмбрионов ранних стадий развития. Результаты, приведенные в данной статье, можно интерпретировать как предварительные, поскольку продолжение настоящего исследования актуально как с точки зрения получения эмбрионов более поздних стадий развития, так и с целью определения их качества.

**Ключевые слова:** соматическое клонирование; фетальные фибробласты; сывороточное голодание; реконструированные ооциты; слияние; клонированные эмбрионы.

#### Авторы:

Жукова А. С. — кандидат биологических наук; e-mail: anastasia.s.belyaeva@gmail.com;

Лопухов А. В. — e-mail: vubi\_myaso@mail.ru;

Шедова Е. Н. — e-mail: shedvek@yandex.ru;

Сингина Г. Н. — кандидат биологических наук; e-mail: g\_singina@mail.ru.

ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр животноводства – ВИЖ имени академика Л. К. Эрнста»; Россия, Московская область, Городской округ Подольск, поселок Дубровицы, д. 60.

**Введение.** Соматическое клонирование (somatic cell nuclear transfer, SCNT) – многоступенчатый процесс, результативность которого сопряжена с созданием оптимальных условий на каждом из его этапов. В течение десятилетий, прошедших с даты рождения первого клонированного животного, полученного с использова-

нием дифференцированных соматических клеток [1], ведется непрерывная работа по усовершенствованию протокола данной технологии [2]. Основа соматического клонирования – замена генетического материала ооцита-реципиента (цитопласта) на ядро донорской клетки (кариопласта). Существует практика, при которой в

ооцит переносят непосредственно донорское ядро [3], однако более распространен способ, когда осуществляется перенос целой соматической клетки (СК) с последующим слиянием мембран цитопласта и кариопласта [4–7]. Объединение комплексов энуклеированный ооцит/СК достигается различными способами: применение инактивированного вируса Сендай [8], использование химических фузогенных препаратов, таких как липофектамин [9] и полиэтиленгликоль [10, 11]. Однако самым распространенным способом является электрослияние [12].

В ряде исследований авторы ограничиваются однократным воздействием, но существует практика, при которой не слившиеся после первого электрического воздействия комплексы подвергают повторному электрическому стимулу [4, 7, 13]. Данная мера направлена на получение большего количества цитогрибидов (продуктов слияния энуклеированного ооцита и СК) и, как следствие, большего количества эмбрионов. Тем не менее, электрическая стимуляция может приводить к повреждению внутриклеточных мембран, включая мембраны эндоплазматического ретикулума (ЭПР), митохондрий и ядра, тем самым индуцируя апоптотические изменения в клетках [14]. Ограниченное количество данных о числе получаемых цитогрибидов и доле раздробившихся эмбрионов после повторного электрослияния при проведении клонирования овец мотивирует на анализ целесообразности данного подхода.

Ключевым событием, определяющим потенциал к развитию клонированных эмбрионов, является репрограммирование генетического материала СК компонентами цитоплазмы ооцита, что необходимо для индукции свойств тотипотентности [15]. Одним из условий, необходимых для инициации репрограммирования, является высокая активность фактора, способствующего созреванию (maturation promoting factor, MPF) в ооците-реципиенте [16, 17], в связи с чем в качестве цитопластов при SCNT наиболее часто применяют клетки в метафазе II мейотического деления, поскольку на данной стадии активность фактора достигает наибольших значений [18]. Другим необходимым условием успешного репрограммирования является координация клеточного цикла кариопласта и ооцита-реципиента. Несмотря на то, что в качестве кариопластов применяют клетки в фазах G2 и M клеточного цикла, наилучшие результаты достигаются при переносе донорской клетки на стадии G0/G1 в ооцит в метафазе II мейотического деления [19]. Существуют различные подходы к остановке клеток в данной фазе цикла, однако чаще всего применяют сывороточное голодание (СГ — куль-

тивирование СК в среде, содержащей экстремально низкую концентрацию сыворотки), контактное ингибирование (культивирование СК до монослоя с конфлюэнтностью, близкой к 100%), или комбинированный способ, когда клетки культивируют до формирования монослоя и затем меняют культуральную среду на обедненную [20]. Несмотря на доказанную эффективность метода СГ, применять его следует с осторожностью, поскольку длительное культивирование соматических клеток в условиях СГ на этапе подготовки к процедуре SCNT оказывает негативное влияние на последующее развитие клонированных эмбрионов [21]. Значимое повреждающее воздействие культивирования донорских клеток в обедненной среде выявляется при продолжительности более 72 часов, тем не менее, существуют данные о нарушениях в ЭПР клеток уже через 48 часов СГ [22].

**Цель исследования** — анализ влияния кратности электрослияния на результативность клонирования у овец и зависимость данного влияния от продолжительности сывороточного голодания соматических клеток.

**Материалы и методы.** Данная работа была выполнена на базе лаборатории экспериментальной эмбриологии ФГБНУ «ФИЦ ВИЖ им. Л.К. Эрнста». Все манипуляции с ооцитами и эмбрионами вне инкубатора проводились при 37°C.

#### *Подготовка соматических клеток.*

В качестве кариопластов нами была использована культура фетальных фибробластов (ФФБ) IV-V пассажа. За несколько дней до проведения SCNT клетки размораживали и культивировали в среде DMEM, дополненной 15 % фетальной бычьей сыворотки (ФБС), 50 мкг/мл гентамицина, 1 % незаменимых аминокислот [23]. С целью остановки клеточного цикла ФФБ на стадии G0/G1 при достижении ими монослоя с конфлюэнтностью, близкой к 90%, среду меняли на DMEM аналогичного состава, но с содержанием ФБС 0,5 %. В данных условиях ФФБ культивировали в течение 24 и 48 часов. В день эксперимента готовили суспензию клеток: ростовую среду заменяли раствором трипсин/ЭДТА, инкубировали при 37°C в течение 7 минут, после чего открепившиеся ФФБ переносили в пробирки со средой TC-199, дополненной 25 мМ NaHCO<sub>3</sub>, 0,5 мМ пирувата натрия, 50 мкг/мл гентамицина и 0,1 % бычьего сывороточного альбумина. Клетки осаждали путем центрифугирования при 300 g в течение 7 минут, супернатант удаляли, а осадок ресуспендировали в среде аналогичного состава. Продолжительность хранения ФФБ в суспензии до переноса в энуклеированный ооцит составляла не более 150 минут.

*Подготовка ооцитов.*

Источником ооцитов служили яйцники овец, доставленные из пункта убоя в физиологическом растворе при температуре 30–35°C в течение 2,5–3 часов. Препарирование яйчников, выделение из них ооцитов в составе ооцит-кумулясных комплексов (ОКК), селекция пригодных для культивирования ОКК и их инкубация с целью созревания (*in vitro maturation*, IVM) проводились по ранее описанному протоколу [24].

*Реконструирование ооцитов.*

По истечении 19–23 часов IVM производили удаление клеток кумулюса путем инкубации ОКК в среде, содержащей 0,1 % гиалуронидазы и последующего пипетирования через капилляр с внутренним диаметром 135 мкм, после чего отбирали ооциты, имеющие первое полярное тельце (ППТ). Перед реконструированием (процедурой энуклеации ооцитов и переноса в перивителлиновое пространство полученных цитопластов СК) ооциты с ППТ инкубировали в течение 20 минут в среде, содержащей 7,5 мкг/мл цитохалазина В.

Реконструирование проводили с использованием инвертированного микроскопа Nikon Eclipse Ti-U, совмещенного с микроманипуляционной системой Narishige. Для удаления ППТ и переноса единичных фибробластов применяли микропипетку с внутренним диаметром 13–15 мкм. Хромосомы ооцита удаляли слепым методом [23] путем аспирации ППТ и 10–20 % прилегающей цитоплазмы. СК переносили в перивителлиновое пространство через отверстие, образованное при энуклеации ооцита.

*Получение цитогбридов, их активация и постактивационное культивирование.*

Для получения клонированных цитогбридов комплексы ооцит/СК подвергали электрослиянию в буфере, содержащем 270 мМ маннитола, 0,1 мМ MgSO<sub>4</sub>, 0,05 мМ CaCl<sub>2</sub>, используя мультипоратор фирмы Eppendorf. Воздействовали сначала электрическим полем переменного тока (5В, 5с), затем двумя последовательными импульсами постоянного тока (40В, 20мкс). После выполнения электро-

слияния комплексы хранили в среде ТС – 199, содержащей 10 % ФБС, в условиях инкубатора. Через 60 минут инкубации проводили отбор образовавшихся цитогбридов. Неслившиеся комплексы подвергали повторному слиянию.

Цитогбриды, полученные после однократного и повторного слияния, активировали в течение 5 минут в среде, содержащей 5 мМ иономицина. Постактивационное культивирование осуществлялось в среде, дополненной 2 мМ 6-диметиламинопурина (6-ДМАП) и 10 мкг/мл циклогексимида, в течение 4 часов в условиях инкубатора [25].

Последующее культивирование реконструированных эмбрионов происходило в условиях, описанных ранее [23]. После 48 часов культивирования определяли количество раздробившихся цитогбридов.

Статистическая обработка полученных данных была реализована с применением программы SPSS Statistics 21 (США). Данные представлены как среднее  $\pm$  стандартное отклонение ( $M \pm SD$ ). Оценку статистической значимости различий проводили с использованием t-критерия Стьюдента для независимых выборок. Различия считали статистически значимыми при  $p < 0,05$ .

**Результаты и обсуждение.** В ходе проведения данного исследования было реконструировано 504 ооцита. Показатели слияния мы рассчитывали как число полученных цитогбридов от количества реконструированных ооцитов (комплексов ооцит/СК). Показатели дробления оценены нами как число раздробившихся эмбрионов от числа слившихся цитогбридов. Результаты оценки показателей слияния и дробления в зависимости от продолжительности культивирования фибробластов в среде с экстремально низким содержанием ФБС представлены в таблицах 1 и 2.

Показано, что число цитогбридов, полученных при первом и повторном слиянии, соизмеримо и не зависит от продолжительности СГ соматических клеток ( $p > 0,05$ ), что согласуется с описанными ранее результатами [13].

Выявлено, что продолжительность СГ карิโอпластов оказывает влияние на показатели дробле-

**Таблица 1. Результативность получения клонированных цитогбридов в зависимости от продолжительности сывороточного голодания соматических клеток и кратности слияния**

| Продолжительность СГ | Число повторов | Первое слияние                             |                         | Повторное слияние                          |                         |
|----------------------|----------------|--------------------------------------------|-------------------------|--------------------------------------------|-------------------------|
|                      |                | Число комплексов ооцит/СК <sup>а</sup> , п | Получено цитогбридов, % | Число комплексов ооцит/СК <sup>б</sup> , п | Получено цитогбридов, % |
| 24 часа              | 21             | 307                                        | 27,8 $\pm$ 13,47        | 217                                        | 26,4 $\pm$ 13,45        |
| 48 часов             | 12             | 197                                        | 29,8 $\pm$ 14,47        | 132                                        | 29,8 $\pm$ 10,39        |

**Примечание:** СГ – сывороточное голодание, СК – соматическая клетка. <sup>а</sup> – число реконструированных ооцитов; <sup>б</sup> – число комплексов ооцит/соматическая клетка, не объединившихся после проведения первого слияния

ния цитогбридов, полученных при проведении первого слияния комплексов ооцит/СК. Обнаружено статистически значимо более высокое количество раздробившихся эмбрионов при использовании в качестве кариопластов клеток, подвергавшихся 48-часовому СГ ( $p=0,010$ ). В то же время доля раздробившихся цитогбридов, полученных при повторном слиянии, не зависела от продолжительности СГ кариопластов ( $p>0,05$ ).

Тем не менее, при увеличении продолжительности СГ фетальных фибробластов до 48 часов обнаруживаются статистически значимые различия между долей раздробившихся цитогбридов, полученных при первом и повторном слиянии. Так, число раздробившихся эмбрионов в группе повторного слияния в 1,98 раз ниже по сравнению с соответствующим показателем в группе первого слияния ( $p=0,005$ ). В контексте имеющихся данных о способности электрического воздействия вызывать спонтанную активацию ооцитов [16, 26], следует отметить, что предварительная активация энуклеированных цитопластов перед переносом донорских клеток, находящихся в фазе G0/G1 митотического цикла, является причиной более низких показателей дробления [27, 28], в то время как на долю слившихся комплексов ооцит/СК данное воздействие не оказывает статистически значимого влияния [27]. Более того, снижение активности MPF, сопровождающее активацию ооцитов после электрического воздействия [16, 29], может препятствовать корректному репрограммированию ядер кариопластов. Данная гипотеза подтверждается результатами исследования [30], демонстрирующими более высокий уровень H3K9me3 в клонированных эмбрионах кроликов после электрослияния цитопластов и кариопластов, что является основным эпигенетическим препятствием для процесса ядерного репрограммирования СК за счет блока активации зиготического генома [15]. Нельзя исключать также, что при проведении первого слияния происходит формирование цитогбридов СК с ооцитами, обладающими более выраженным потенциалом к эмбриональному развитию.

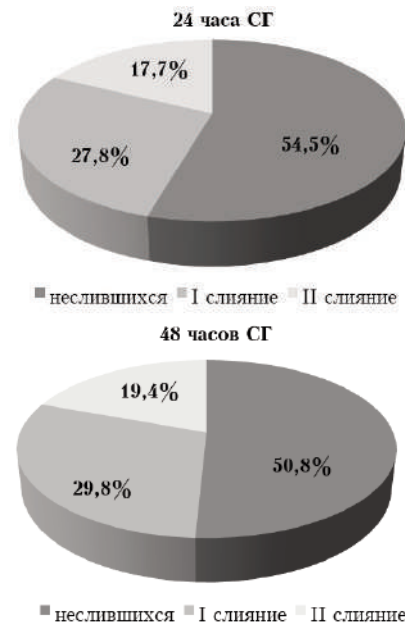


Рис. 1. Доля цитогбридов, полученных при первом и повторном слиянии, рассчитанная от общего числа реконструированных ооцитов.

Примечания: I слияние – количество цитогбридов, полученное после первого слияния; II слияние – количество цитогбридов, полученное после повторного слияния СГ – сывороточное голодание

Обращает на себя внимание тот факт, что в исследовании, проведенном нами на крупном рогатом скоте, не было выявлено значимых различий в количестве раздробившихся цитогбридов, полученных при первом и повторном слиянии [31]. Данные различия могут быть следствием как видовой специфичности, так и неодинаковыми условиями синхронизации клеточного цикла кариопластов: в исследовании, проведенном на крупном рогатом скоте, подготовка СК осуществлялась путем контактного ингибирования.

На следующем этапе мы проанализировали целесообразность применения повторного электрослияния с точки зрения увеличения итогового количества клонированных эмбрионов. Нами была рассчитана доля цитогбридов, полученных при первом и повторном слиянии, от числа всех реконструированных ооцитов – результаты представлены на рисунке 1.

Таблица 2. Развитие эмбрионов в зависимости от продолжительности сывороточного голодания соматических клеток и кратности слияния

| Продолжительность СГ | Число повторов | Первое слияние       |                                  | Повторное слияние    |                                  |
|----------------------|----------------|----------------------|----------------------------------|----------------------|----------------------------------|
|                      |                | Число цитогбридов, n | Доля раздробившихся эмбрионов, % | Число цитогбридов, n | Доля раздробившихся эмбрионов, % |
| 24 часа              | 21             | 83                   | 39,6±25,77                       | 54                   | 30,0±36,61                       |
| 48 часов             | 12             | 58                   | 62,2±21,48*                      | 37                   | 31,4±26,43§                      |

Примечание: СГ – сывороточное голодание, \*  $p<0,05$  по сравнению с соответствующим показателем при 24-часовом СГ, §  $p<0,05$  между первым и повторным слиянием

Общее количество полученных цитогибридов при 24- и 48-часовом СГ составило  $45,5 \pm 16,16\%$  и  $49,2 \pm 12,72\%$  от числа реконструированных ооцитов соответственно ( $p=0,467$ ). При проведении повторного слияния доля получаемых цитогибридов оказалась ниже в 1,5 раза, чем при первом слиянии как при 24-, так и при 48-часовом СГ.

Далее мы оценили количество раздробившихся цитогибридов, полученных от первого и повторного слияния, в контексте повышения общего числа полученных клонированных эмбрионов. Результаты представлены на рисунке 2. Общее количество раздробившихся эмбрионов от итогового числа полученных цитогибридов достигло  $36,4 \pm 20,48\%$  при СГ в течение 24 часов и  $50,7 \pm 14,72\%$  при СГ в течение 48 часов ( $p=0,029$ ). Сравнение числа раздробившихся цитогибридов выявило более низкие показатели дробления в группе повторного слияния: в 1,8 и 2,5 раза ниже, чем соответствующие показатели при первом слиянии в случае 24- и 48-часового СГ, соответственно.

Несмотря на более низкую эффективность повторного слияния по сравнению с первым, доля объединившихся после повторного слияния комплексов достигает 39 % от числа всех полученных цитогибридов как при 24-часовом, так и при 48- часовом СГ. Доля раздробившихся цитогибридов, полученных в ходе повторного слияния, составляет 35,2 % и 28,6 % от общего числа раздробившихся эмбрионов при 24- и 48-часовом СГ, соответственно, что свидетельствует о целесообразности проведения повторного электрического воздействия для повышения общего количества эмбрионов овец при клонировании.

**Заключение.** Таким образом, эффективность получения клонированных эмбрионов ранних стадий развития зависит как от кратности слияния комплексов ооцит/соматическая клетка, так и от продолжительности сывороточного голодания кардиоцитов на этапе их подготовки к соматическо-

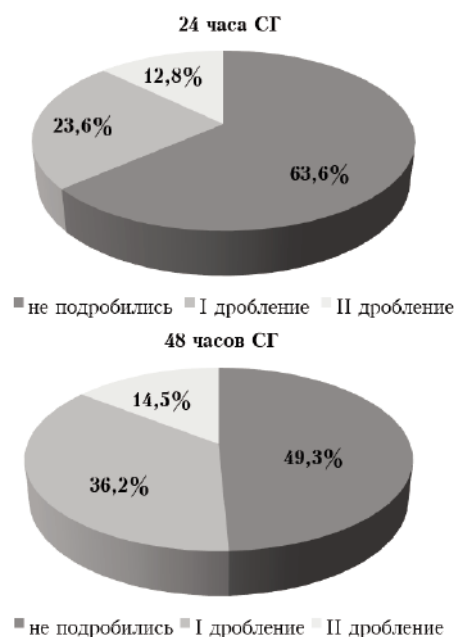


Рис. 2. Доля раздробившихся цитогибридов, полученных после первого и повторного слияния, рассчитанная от общего числа слившихся цитогибридов.

Примечания: I дробление – количество раздробившихся цитогибридов, полученных после первого слияния; II дробление – количество раздробившихся цитогибридов, полученных после повторного слияния; СГ – сывороточное голодание.

му клонированию. Проведение повторного слияния менее эффективно с точки зрения получения клонированных эмбрионов по сравнению с однократным воздействием. В то же время на количество раздробившихся цитогибридов, полученных от первого слияния, влияет продолжительность сывороточного голодания соматических клеток, оптимальным значением которой явилось 48 часов. Результаты, приведенные в данной статье, можно интерпретировать как предварительные, поскольку продолжение настоящего исследования актуально как с точки зрения получения эмбрионов более поздних стадий развития, так и с целью определения их качества.

## Литература

1. Wilmut I. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells / I. Wilmut, A. Schnieke, J. McWhir, Kind A. J., Campbell K. H. // *Nature*. – 1997. – Vol. 385. – № 6619. – P. 810–813.
2. Srirattana K. Strategies to improve the efficiency of somatic cell nuclear transfer / K. Srirattana, M. Kaneda, R. Parnpai // *International journal of molecular sciences*. – 2022. – Vol. 23. – Article number 1969.
3. Liu L. Nuclear transfer and cloning / L. Liu // *Transgenic mouse. Methods in molecular biology* / ed. M. Larson. – New York: Humana, 2020. – Vol. 2066. – P. 113–124.
4. Demir K. Effects of serum starvation and ionomycin activation on the development of somatic cell nuclear transfer embryos in sheep / K. Demir, S. Pabuccuoglu, U. Cirit, M. Evecen, E. Karaman, O. B. Ozdas, S. Alkan, H. Atalla, S. Birler // *Ankara Universitesi Veteriner Fakultesi Dergisi*. – 2019. – Vol. 66. – P. 37–42.
5. Al-Ghadi M. Q. The in vitro development of cloned sheep embryos treated with Scriptaid and Trichostatin (A) / M. Q. Al-Ghadi, A. R. Alhimaidi, D. Iwamoto, M. G. Al-Mutary, A. A. Ammari, K. O. Saeki, M. S. Aleissa // *Saudi Journal of Biological Sciences*. – 2020. – Vol. 27, № 9. – P. 2280–2286.

6. Xu J. Cell synchronization by Rapamycin improves the developmental competence of buffalos (*Bubalus bubalis*) somatic cell nuclear transfer embryos / J. Xu, P. Shi, X. Zhao, P. Shen, Feng Y., Lu F., Shi D. // *Reproduction in Domestic Animals*. – 2021. – Vol. 56. – P. 313–323.
7. Yao Y. Melatonin promotes the development of sheep transgenic cloned embryos by protecting donor and recipient cells / Y. Yao, A. Yang, G. Li, H. Wu, S. Deng, H. Yang, W. Ma, D. Lv, Y. Fu, P. Ji, X. Tan, W. Zhao, Z. Lian, L. Zhang, Liu G. // *Cell Cycle*. – 2022. – Vol. 21. – № 13. – P. 1360–1375.
8. Song B. S. Inactivated Sendai-virus-mediated fusion improves early development of cloned bovine embryos by avoiding endoplasmic-reticulum-stress-associated apoptosis // B. S. Song, J. S. Kim et al. // *Reproduction, Fertility and Development*. – 2011. – Vol. 23. – № 6. – P. 826–836.
9. Moutos C. A novel method of somatic cell nuclear transfer to generate artificial oocytes / C. Moutos, P. Xie et al. // *Human Reproduction*. – 2024. – Vol. 39. – Suppl.1. – Article deae108.1108.
10. Sims M. Production of calves by transfer of nuclei from cultured inner cell mass cells / M. Sims, N. L. First // *Proceedings of the National Academy of Sciences U S A*. – 1994. – Vol. 91. – № 13. – P. 6143–6147.
11. Tesarik J. Chemically and mechanically induced membrane fusion: non-activating methods for nuclear transfer in mature human oocytes / J. Tesarik, Z.P. Nagy, C. Mendoza, E. Greco // *Human Reproduction*. – 2000. – Vol. 15. – № 5. – P. 1149–1154.
12. Ma Y. Recent advances in critical nodes of embryo engineering technology / Y. Ma, M. Gu et al. // *Theranostics*. – 2021. – Vol. 11. – № 15. – P. 7391–7424.
13. Melican D. Effect of serum concentration, method of trypsinization and fusion/activation utilizing transfected fetal cells to generate transgenic dairy goats by somatic cell nuclear transfer / D. Melican, R. Butler et al. // *Theriogenology*. – 2005. – Vol. 63. – № 6. – P. 1549–1563.
14. Li W. Selenoprotein W as a molecular target of d-amino acid oxidase is regulated by d-amino acid in chicken neurons // W. Li, M. Talukder, X. T. Sun, C. Zhang, X. N. Li, J. Ge, J. L. Li // *Metalomics: integrated biometal science*. – 2018. – Vol. 10. – P. 751–758.
15. Matoba S. Somatic cell nuclear transfer reprogramming: mechanisms and applications / S. Matoba, Y. Zhang // *Cell Stem Cell*. – 2018. – Vol. 23. – № 4. – P. 471–485.
16. Campbell K. H. S. Nuclear-cytoplasmic interactions during the first cell cycle of nuclear transfer reconstructed bovine embryos: implications for deoxyribonucleic acid replication and development / K. H. S. Campbell, W. A. Ritchie, I. Wilmut // *Biology of Reproduction*. – 1993. – Vol. 49. – № 5. – P. 933–942.
17. Cervera R. P. Primate and human somatic cell nuclear transfer / R. P. Cervera, S. Mitalipov // *Biology and pathology of the oocyte: Role in fertility, medicine, and nuclear reprogramming* / ed. A. Trounson, R. Gosden, U. Eichenlaub-Ritter. – 2nd ed. – Cambridge: Cambridge University Press, 2013. – P. 274–284.
18. Wu B. Dynamics of maturation-promoting factor and its constituent proteins during in vitro maturation of bovine oocytes / B. Wu, G. Ignatz, W. B. Currie, X. Yang // *Biology of Reproduction*. – 1997. – Vol. 56. – № 1. – P. 253–259.
19. Kato Y. Role of the donor nuclei in cloning efficiency: can the ooplasm reprogram any nucleus? / Y. Kato, Y. Tsunoda // *The International Journal of Developmental Biology*. – 2010. – Vol. 54. – № 11–12. – P. 1623–1629.
20. Жукова А. С. Способы синхронизации клеточного цикла кариопластов для повышения результативности соматического клонирования сельскохозяйственных животных / А. С. Жукова // *Гены и клетки*. – 2024. – Т. 19. – № 3.
21. Park H. J. Effect of roscovitine treated donor cells on development of porcine cloned embryos / H.J. Park, O. J. Koo, D. K. Kwon, Kang J. T., Jang G., Lee B. C. // *Reproduction in Domestic Animals*. – 2010. – Vol. 45. – № 6. – P. 1082–1088.
22. Zhang Y. Tauroursodeoxycholic acid (TUDCA) alleviates endoplasmic reticulum stress of nuclear donor cells under serum starvation / Y. Zhang, P. Qu, X. Ma et al. // *PLoS One*. – 2018. – Vol. 13. – № 5. – Article number e0196785.
23. Сингина Г. Н. Влияние условий подготовки ооцитов и донорских клеток на эффективность соматического клонирования у домашней овцы (*Ovis aries* L.) / Г. Н. Сингина, А. В. Лопухов, Е. Н. Шедова, А. С. Жукова // *Сельскохозяйственная биология*. – 2024. – Т. 59. – № 4. – С. 692–703.

24. Сингина Г. Н. Результаты получения и трансплантации IVER эмбрионов у овец (*Ovis aries*) / Г. Н. Сингина, В. А. Луканина, Е. Н. Шедова, Р. Ю. Чинаров, Е. А. Гладырь, Е. В. Цындрин // Сельскохозяйственная биология. — 2023. — Т. 58. — № 6. — С. 1088–1099.
25. Шедова Е. Н. Влияние продолжительности воздействия циклогексимида и 6-диметиламинопурина (6-ДМАП) на развитие клонированных эмбрионов крупного рогатого скота. / Е. Н. Шедова, А. В. Лопухов // Генетика и разведение животных. — 2020. — №4. — С. 85–91.
26. Koo D.B. In vitro development of reconstructed porcine oocytes after somatic cell nuclear transfer / D.B. Koo, Y.K. Kang et al. // Biology of Reproduction. — 2000. — Vol. 63. — P. 986–992.
27. Tani T. Direct exposure of chromosomes to nonactivated ovum cytoplasm is effective for bovine somatic cell nucleus reprogramming / T. Tani, Y. Kato, Y. Tsunoda // Biology of Reproduction. — 2001. — Vol. 64. — № 1. — P. 324–330.
28. Atabay E. C. Effect of activation treatments of recipient oocytes on subsequent development of bovine nuclear transfer embryos / E. C. Atabay, S. Katagiri, M. Nagano, Y. Takahashi // Japanese Journal of Veterinary Research. — 2003. — Vol. 50. — № 4. — P. 185–194.
29. Wang W. Electrofusion stimulation is an independent factor of chromosome abnormality in mice oocytes reconstructed via spindle transfer / W. Wang, S. Shao et al. // Frontiers in Endocrinology (Lausanne). — 2021. — Vol. 12. — Article number 705837.
30. Qu P. Melatonin protects rabbit somatic cell nuclear transfer (SCNT) embryos from electrofusion damage / P. Qu, C. Shen, Y. Du, H. Qin, S. Luo, S. Fu, Y. Dong, S. Guo, F. Hu, Y. Xue, E. Liu // Scientific Reports. — 2020. — Vol. 10. — Article number 2186.
31. Сингина Г. Н. Развитие клонированных эмбрионов крупного рогатого скота in vitro в зависимости от параметров слияния и активации / Г. Н. Сингина, А. В. Лопухов, Е. Н. Шедова // Сельскохозяйственная биология. — 2020. — Т. 55. — № 2. — С. 295–305.

---

Zhukova A., Lopukhov A., Shedova E., Singina G.

## Efficiency of sheep somatic cloning depending on fusion conditions and karyoplast preparation

### Abstract.

The *aim* of this study was to evaluate the impact of the frequency of electrofusion on the efficiency of sheep cloning and to assess the dependence of this effect on the duration of serum starvation of somatic cells (SC).

**Materials and Methods.** Fetal fibroblasts at passages IV-V were used as donor cells for somatic cloning. To arrest the SCs in the G0/G1 phase of the cell cycle, after reaching near-confluence (approximately 90%), the cells were subjected to serum starvation (SS) for 24 and 48 hours. Recipient oocytes were collected from post-mortem sheep ovaries, matured in vitro, and reconstructed through enucleation followed by the transfer of SC into their perivitelline space. Electrofusion was used to combine the oocyte/SC complexes. The oocyte/SC complexes were fused using electrofusion in a buffer containing 270 mM mannitol, which involved the application of two sequential direct current pulses at 40 V for 20  $\mu$ s. Complexes that did not fuse after the first treatment were subjected to a second round of electrofusion. The obtained cytohybrids were activated using ionomycin, followed by a 4-hour incubation in the presence of 6-dimethylaminopurine and cycloheximide, and subsequently cultured for 48 hours to assess embryonic development.

**Results.** In this study, a total of 504 oocytes were reconstructed. A statistically significant higher number of cleaved cytohybrids was observed from the first fusion when fetal fibroblasts subjected to 48-hour SS were used as karyoplasts. The number of embryos obtained from the second fusion was not dependent on the du-

ration of SS in SCs. When SCs subjected to 48-hour SS were used, statistically significant differences were found between the proportion of cleaved cytohybrids from the first and second fusions:  $62,2 \pm 21,48\%$  and  $31,4 \pm 26,43\%$ , respectively ( $p=0,010$ ). The proportion of cleaved cytohybrids obtained from the second fusion was  $35,2\%$  and  $28,6\%$  of the total number of cloned embryos for 24-hour and 48-hour SS, respectively, which significantly contributed to the total number of early-stage embryos. The results presented in this article should be considered preliminary, as further research is necessary to obtain embryos at later developmental stages and to assess their quality.

**Key words:** somatic cell nuclear transfer; fetal fibroblasts; serum starvation; reconstructed oocytes; electrofusion; cloned embryos

**Authors:**

**Zhukova A.** — PhD (Biol. Sci.); e-mail: anastasia.s.belyaeva@gmail.com;

**Lopuchov A.** — e-mail: vubi\_myaso@mail.ru;

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

**Singina G.** — PhD (Biol. Sci.); e-mail: g\_singina@mail.ru.

L. K. Ernst Federal Research Center for Animal Husbandry; 142132, Russian Federation, Moscow region, Podolsk city district, Dubrovitsy settlement 60.

## References

1. Wilmut I. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells / I. Wilmut, A. Schnieke, J. McWhir, Kind A. J., Campbell K. H. // *Nature*. — 1997. — Vol. 385. — № 6619. — P. 810–813.
2. Srirattana K. Strategies to improve the efficiency of somatic cell nuclear transfer / K. Srirattana, M. Kaneda, R. Parnpai // *International journal of molecular sciences*. — 2022. — Vol. 23. — Article number 1969.
3. Liu L. Nuclear transfer and cloning / L. Liu // *Transgenic mouse. Methods in molecular biology* / ed. M. Larson. — New York: Humana, 2020. — Vol. 2066. — P. 113–124.
4. Demir K. Effects of serum starvation and ionomycin activation on the development of somatic cell nuclear transfer embryos in sheep / K. Demir, S. Pabuccuoglu et al. // *Ankara Universitesi Veteriner Fakultesi Dergisi*. — 2019. — Vol. 66. — P. 37–42.
5. Al-Ghadi M. Q. The in vitro development of cloned sheep embryos treated with Scriptaid and Trichostatin (A) / M. Q. Al-Ghadi, A. R. Alhimaidi, D. Iwamoto, M. G. Al-Mutary, A. A. Ammari, K. O. Saeki, M. S. Aleissa // *Saudi Journal of Biological Sciences*. — 2020. — Vol. 27, № 9. — P. 2280–2286.
6. Xu J. Cell synchronization by Rapamycin improves the developmental competence of buffalos (*Bubalus bubalis*) somatic cell nuclear transfer embryos / J. Xu, P. Shi, X. Zhao, P. Shen, Feng Y., Lu F., Shi D. // *Reproduction in Domestic Animals*. — 2021. — Vol. 56. — P. 313–323.
7. Yao Y. Melatonin promotes the development of sheep transgenic cloned embryos by protecting donor and recipient cells / Y. Yao, A. Yang, G. Li, H. Wu, S. Deng, H. Yang, W. Ma, D. Lv, Y. Fu, P. Ji, X. Tan, W. Zhao, Z. Lian, L. Zhang, Liu G. // *Cell Cycle*. — 2022. — Vol. 21. — № 13. — P. 1360–1375.
8. Song B. S. Inactivated Sendai-virus-mediated fusion improves early development of cloned bovine embryos by avoiding endoplasmic-reticulum-stress-associated apoptosis // B. S. Song, J. S. Kim et al. // *Reproduction, Fertility and Development*. — 2011. — Vol. 23. — № 6. — P. 826–836.
9. Moutos C. A novel method of somatic cell nuclear transfer to generate artificial oocytes / C. Moutos, P. Xie et al. // *Human Reproduction*. — 2024. — Vol. 39. — Suppl.1. — Article deae108.1108.
10. Sims M. Production of calves by transfer of nuclei from cultured inner cell mass cells / M. Sims, N. L. First // *Proceedings of the National Academy of Sciences U S A*. — 1994. — Vol. 91. — № 13. — P. 6143–6147.
11. Tesarik J. Chemically and mechanically induced membrane fusion: non-activating methods for nuclear transfer in mature human oocytes / J. Tesarik, Z.P. Nagy, C. Mendoza, E. Greco // *Human Reproduction*. — 2000. — Vol. 15. — № 5. — P. 1149–1154.
12. Ma Y. Recent advances in critical nodes of embryo engineering technology / Y. Ma, M. Gu et al. // *Theranostics*. — 2021. — Vol. 11. — № 15. — P. 7391–7424.
13. Melican D. Effect of serum concentration, method of trypsinization and fusion/activation utilizing transfected fetal cells to generate transgenic dairy goats by somatic cell nuclear transfer / D. Melican, R. Butler et al. // *Theriogenology*. — 2005. — Vol. 63. — № 6. — P. 1549–1563.

14. Li W. Selenoprotein W as a molecular target of d-amino acid oxidase is regulated by d-amino acid in chicken neurons // W. Li, M. Talukder, X. T. Sun, C. Zhang, X. N. Li, J. Ge, J. L. Li // *Metal-omics: integrated biometal science*. – 2018. – Vol. 10. – P. 751–758.
15. Matoba S. Somatic cell nuclear transfer reprogramming: mechanisms and applications / S. Matoba, Y. Zhang // *Cell Stem Cell*. – 2018. – Vol. 23. – № 4. – P. 471–485.
16. Campbell K. H. S. Nuclear-cytoplasmic interactions during the first cell cycle of nuclear transfer reconstructed bovine embryos: implications for deoxyribonucleic acid replication and development / K. H. S. Campbell, W. A. Ritchie, I. Wilmut // *Biology of Reproduction*. – 1993. – Vol. 49. – № 5. – P. 933–942.
17. Cervera R. P. Primate and human somatic cell nuclear transfer / R. P. Cervera, S. Mitalipov // *Biology and pathology of the oocyte: Role in fertility, medicine, and nuclear reprogramming* / ed. A. Trounson, R. Gosden, U. Eichenlaub-Ritter. – 2nd ed. – Cambridge: Cambridge University Press, 2013. – P. 274–284.
18. Wu B. Dynamics of maturation-promoting factor and its constituent proteins during in vitro maturation of bovine oocytes / B. Wu, G. Ignatz, W. B. Currie, X. Yang // *Biology of Reproduction*. – 1997. – Vol. 56. – № 1. – P. 253–259.
19. Kato Y. Role of the donor nuclei in cloning efficiency: can the ooplasm reprogram any nucleus? / Y. Kato, Y. Tsunoda // *The International Journal of Developmental Biology*. – 2010. – Vol. 54. – № 11–12. – P. 1623–1629.
20. Zhukova A. S. Methods of synchronizing the karyoplast cell cycle to improve the efficiency of somatic cloning of farm animals / A. S. Zhukova // *Genes and cells*. – 2024. – V. 19. – № 3.
21. Park H. J. Effect of roscovitine treated donor cells on development of porcine cloned embryos / H. J. Park, O. J. Koo, D. K. Kwon, J. T. Kang, G. Jang, B. C. Lee // *Reproduction in Domestic Animals*. – 2010. – Vol. 45. – № 6. – P. 1082–1088.
22. Zhang Y. Tauroursodeoxycholic acid (TUDCA) alleviates endoplasmic reticulum stress of nuclear donor cells under serum starvation / Y. Zhang, P. Qu, X. Ma et al. // *PLoS One*. – 2018. – Vol. 13. – № 5. – Article number e0196785.
23. Singina G. N. Effect of conditions for preparing oocytes and donor cells on the efficiency of somatic cloning in domestic sheep (*Ovis aries* L.) / G. N. Singina, A. V. Lopukhov, E. N. Shedova, A. S. Zhukova // *Agricultural Biology*. – 2024. – Vol. 59. – № 4. – P. 692–703.
24. Singina G. N. Results of obtaining and transplanting IVEP embryos in sheep (*Ovis aries*) / G. N. Singina, V. A. Lukanina, E. N. Shedova, R. Yu. Chinarov, E. A. Gladyr, E. V. Tsyndrina // *Agricultural Biology*. – 2023. – Vol. 58. – № 6. – P. 1088–1099.
25. Shedova E. N. Effect of duration of exposure to cycloheximide and 6-dimethylaminopurine (6-DMAP) on the development of cloned cattle embryos. / E. N. Shedova, A. V. Lopukhov // *Genetics and animal breeding*. – 2020. – № 4. – P. 85–91.
26. Koo D.B. In vitro development of reconstructed porcine oocytes after somatic cell nuclear transfer / D.B. Koo, Y.K. Kang et al. // *Biology of Reproduction*. – 2000. – Vol. 63. – P. 986–992.
27. Tani T. Direct exposure of chromosomes to nonactivated ovum cytoplasm is effective for bovine somatic cell nucleus reprogramming / T. Tani, Y. Kato, Y. Tsunoda // *Biology of Reproduction*. – 2001. – Vol. 64. – № 1. – P. 324–330.
28. Atabay E. C. Effect of activation treatments of recipient oocytes on subsequent development of bovine nuclear transfer embryos / E. C. Atabay, S. Katagiri, M. Nagano, Y. Takahashi // *Japanese Journal of Veterinary Research*. – 2003. – Vol. 50. – № 4. – P. 185–194.
29. Wang W. Electroporation stimulation is an independent factor of chromosome abnormality in mice oocytes reconstructed via spindle transfer / W. Wang, S. Shao et al. // *Frontiers in Endocrinology (Lausanne)*. – 2021. – Vol. 12. – Article number 705837.
30. Qu P. Melatonin protects rabbit somatic cell nuclear transfer (SCNT) embryos from electroporation damage / P. Qu, C. Shen, Y. Du, H. Qin, S. Luo, S. Fu, Y. Dong, S. Guo, F. Hu, Y. Xue, E. Liu // *Scientific Reports*. – 2020. – Vol. 10. – Article number 2186.
31. Singina G. N. Development of cloned cattle embryos in vitro depending on the parameters of fusion and activation / G. N. Singina, A. V. Lopukhov, E. N. Shedova // *Agricultural biology*. – 2020. – Vol. 55. – № 2. – P. 295–305.