


Биотехнологические основы получения клонированных эмбрионов свиней

А.В. Лопухов , Г.Н. Сингина, Н.А. Зиновьева

Федеральный научный центр животноводства – ВИЖ им. академика Л.К. Эрнста, Москва, Россия

 e-mail: vubi_myaso@mail.ru

Термин «клон» в биотехнологии животных обозначает организм, полученный в результате неполового размножения, который одновременно является прямым потомком и генетической копией родительского организма. На сегодняшний день домашняя свинья (*Sus scrofa domestica*) представляется наиболее интересным объектом в исследованиях по клонированию. Клонирование свиней имеет широкий спектр потенциальных возможностей использования в различных областях научной и хозяйственной деятельности человека. Тем не менее эффективность получения клонированных эмбрионов свиней все еще остается ниже, чем других видов сельскохозяйственных животных, в частности лошадей и крупного рогатого скота. Соматическое клонирование – сложная многоступенчатая технология, на каждом этапе которой более восприимчивые к изменениям окружающих условий условий ооциты свиней испытывают неблагоприятные воздействия различных по своей природе факторов (механические, физические, химические). На этапе созревания ооцитов происходят изменения клеточных ультраструктур ооплазмы, которые играют важную роль в последующем репрограммировании ядра пересаженной донорской клетки. Донорские соматические клетки перед переносом в ооцит синхронизируют в стадии G0/G1 клеточного цикла с целью обеспечения нормальной ploidy клонированного эмбриона. При удалении ядра у созревших *in vitro* ооцитов свиней следует обращать внимание на проблему сохранения жизнеспособности клеток после извлечения собственного ядерного материала. В ходе реконструирования соматическую клетку с помощью микроинструментов помещают в перивителлиновое пространство, где ранее находилось первое полярное тельце, или в цитоплазму энуклеированного ооцита. Метод ручного клонирования (*handmade cloning*) предполагает удаление ядра ооцита с последующим слиянием с донорской клеткой без помощи микроманипуляционной техники. Повышенная чувствительность ооцитов к факторам окружающей среды обуславливает особые требования к выбору системы *in vitro* культивирования клонированных эмбрионов свиней. В рамках настоящего обзора проведен мониторинг современных методов, используемых при получении клонированных эмбрионов, выявлены технологические особенности, препятствующие повышению эффективности метода соматического клонирования свиней.


Ключевые слова: домашняя свинья; *Sus scrofa domestica*; ооциты; *in vitro*; соматическое клонирование; слияние; активация; клонированный эмбрион.

Для цитирования: Лопухов А.В., Сингина Г.Н., Зиновьева Н.А. Биотехнологические основы получения клонированных эмбрионов свиней. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2019;23(5):527-533. DOI 10.18699/VJ19.521

Biotechnological bases of the development of cloned pig embryos

A.V. Lopukhov , G.N. Singina, N.A. Zinovieva

Federal Science Center for Animal Husbandry named after Academy Member L.K. Ernst, Moscow, Russia

 e-mail: vubi_myaso@mail.ru

The term 'clone' in animal biotechnology refers to an organism derived from non-sexual reproduction, which is both a direct offspring and a genetic copy of the parent organism. To date, the pig appears to be the most interesting object in cloning research. Somatic cell nuclear transfer in pigs has a wide range of potential applications in various fields of human scientific and economic activities. However, the efficiency of producing cloned embryos in swine is still lower than that of other livestock species, in particular horses and cattle. Somatic cell nuclear transfer is a technically complex multi-stage technology, at each stage of which the pig oocytes, which are more susceptible to changes of surrounding conditions, are affected by various factors (mechanical, physical, chemical). At the stage of oocyte maturation, changes in the cell ultrastructures of the ooplasm occur, which play an important role in the subsequent nuclear reprogramming of the transferred donor cell. Before transfer to the oocyte donor somatic cells are synchronized in the G0/G1 stage of the cell cycle to ensure the normal ploidy of the cloned embryo. When removing the nucleus of pig oocytes matured *in vitro*, it is necessary to pay attention to the problem of preserving the viability of cells, which were devoid of their own nuclear material. To perform the reconstruction, a somatic cell is placed, using micro-tools, in the perivitelline space, where the first polar body was previously located, or in the cytoplasm of an enucleated oocyte. The method of manual cloning involves the

removal of the oocyte nucleus with subsequent fusion with the donor cell without the use of micromanipulation techniques. The increased sensitivity of oocytes to the environmental conditions causes special requirements for the choice of the system for *in vitro* culture of cloned pig embryos. In this work, we have reviewed the modern methods used for the production of cloned embryos and identified the technological issues that prevent improving the efficiency of somatic cloning of pigs.

Key words: domestic pig; *Sus scrofa domestica*; oocytes; *in vitro*; somatic cell nuclear transfer; fusion; activation; cloned embryo.

For citation: Lopukhov A.V., Singina G.N., Zinovieva N.A. Biotechnological bases of the development of cloned pig embryos. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii* = *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2019;23(5):527-533. DOI 10.18699/VJ19.521 (in Russian)

Введение

Способность к репрограммированию ядра соматической клетки, пересаживаемого в энуклеированный ооцит, – один из важнейших феноменов биологической науки, открытие которого сделало возможным получение реконструированных эмбрионов и клонированных животных. Практически это было реализовано в июне 1996 г. группой шотландских исследователей под руководством Я. Уилмута, которые сообщили о рождении первого клонированного млекопитающего – овечки Долли – с использованием дифференцированных клеток (эпителия молочной железы) с наследственным материалом, идентичным другому взрослому животному (Wilmut et al., 1997). Серьезный интерес научного сообщества, вызванный революционным прорывом в данной области репродуктивных технологий, привел к клонированию уже более 20 видов млекопитающих (Сингина и др., 2014).

Получение клонированных поросят впервые было проведено в 2000 г. параллельно двумя исследовательскими группами из США и Японии (Onishi et al., 2000; Polejaeva et al., 2000). Одно из основных направлений технологии клонирования – использование генетически модифицированных свиней как моделей для изучения болезней человека и доноров органов для ксенотрансплантации (Bettauer et al., 2000). В настоящее время такие животные уже находят свое применение в доклинических испытаниях профилактических или терапевтических медицинских препаратов (Liu et al., 2008), тестировании лекарств на токсичность, исследованиях функциональной геномики (Wimmers et al., 2010). Создание генетически модифицированных свиней – потенциальный инструмент для снижения физиологических и иммунологических барьеров на пути к получению и пересадке донорских органов. Другой не менее важной областью практического применения клонирования стоит рассматривать направленное получение животных с заранее заданными параметрами продуктивности посредством копирования особо уникальных высокоценных хряков и свиноматок.

При соматическом клонировании взамен собственного хромосомного материала ооцит (цитопласт) приобретает ядро соматической клетки (кариопласт) от животного, генетическую копию которого планируется получить. Основные этапы технологии клонирования: подготовка (созревание *in vitro*) ооцита-реципиента и донорской клетки, удаление ядерного материала у созревшего ооцита, реконструирование полученного цитопласта (объединение с кариопластом), активация реконструированного ооцита и культивирование клонированного эмбриона (Niemann et al., 2011; Simões, Santos, 2017).

Созревание ооцитов

Способность ооцита к инициации успешного развития в клонированный и партеногенетический эмбрион, а также в эмбрион после *in vitro* оплодотворения в большой степени определяется его созреванием. Цитоплазматическое созревание включает модификации цитоплазмы, в частности перераспределение органелл, изменение динамики цитоскелета, микро- и макромолекулярные изменения (Ferreira et al., 2009). Ядерное созревание подразумевает изменение хроматина в период от разрушения зародышевого пузырька до метафазы второго деления мейоза (МII) (Marteil et al., 2009).

При культивировании ооцитов свиней *in vitro* в отличие от других видов животных используется двухфазный протокол созревания, который позволяет повысить их компетенцию к оплодотворению или искусственной активации. На первом этапе под действием гормонов в ооците вырабатываются белки, необходимые для раннего эмбрионального развития. Второй период созревания проходит без участия внешних сигналов и включает деление ядра и структурирование клеточных органелл. Созревшие ооциты на стадии метафазы II, выделившие первое полярное тельце, как правило, используются в клонировании в качестве источников цитопластов (Hardarson et al., 2000). У свиней оптимальная продолжительность созревания ооцитов *in vitro* варьирует по данным разных исследований в промежутке от 24 до 44 ч (Zhang et al., 2006; Sugimura et al., 2010).

Подготовка донорских соматических клеток

Результативность репрограммирования после переноса ядер соматических клеток зависит от ряда факторов, в том числе от типа, числа пассажей и стадии клеточного цикла донорской клетки (Enright et al., 2003; Yang et al., 2007). Особенно большое значение для успеха клонирования имеет уровень дифференцировки клеток-доноров (Jaenisch, 2012). К настоящему времени получены клонированные эмбрионы свиней с использованием различных типов соматических клеток, таких как фетальные фибробласты, фибробласты кожи, нейральные стволовые клетки, кумулюсные клетки, клетки гранулезы и клетки эпителия молочной железы (Verma et al., 2000; Cervera et al., 2009; Zheng et al., 2009).

Необходимым условием репрограммирования ядра и успешного развития клонированного эмбриона является синхронизация клеточного цикла цитопласта и кариопласта. Для этого донорские клетки всех типов перед микро-манипуляциями, как правило, подвергают искусственному аресту в фазе G0/G1 (Voquest et al., 1999). Перенос ядер

соматических клеток, еще не прошедших репликацию ДНК, в ооцит на стадии метафазы II позволяет снизить вероятность хромосомных аномалий и нарушений ploидности клонированных эмбрионов (Campbell et al., 1996). Координация между клеточными циклами ооцитов и соматических клеток свиней обеспечивается путем сывороточного голодания или контактного ингибирования. Несмотря на то что первые клонированные поросята были получены после пересадки ядер донорских клеток после сывороточного голодания (Polejaeva et al., 2000), у данного метода выявлены негативные эффекты. Так, например, показана инициация апоптотических явлений наряду с повышенной фрагментацией ДНК при культивировании фибробластов свиней в среде с пониженным содержанием сывотки (Kues et al., 2002). Наиболее распространенным методом синхронизации клеточного цикла в рамках процедуры клонирования свиней является контактное ингибирование соматических клеток в конфлюенции (Park et al., 2010). Кроме того, в последнее время все чаще находят свое применение химические антимитотические агенты (мимозин, рапамидин, росковитин и др.) (Vacková et al., 2003; Park et al., 2010; Hyun et al., 2016).

Удаление ядерного материала ооцитов

Полноценное удаление ядерного материала у созревшего ооцита исключает возможность анеуплоидии, снижает вероятность спонтанной партеногенетической активации и аномального развития клонированного эмбриона. Однако ядра ооцитов свиней из-за наличия в цитоплазме жировых включений не визуализируются под инвертированным микроскопом без предварительного окрашивания ДНК флуорохромными красителями в комбинации с ультрафиолетовым излучением (Tatham et al., 1995). Недостаток классической техники состоит в повреждении ультрафиолетовым светом митохондриальной ДНК и органелл ооплазмы. Поэтому в качестве альтернативы прибегают к методу слепой энуклеации, основанному на предположении, что в зрелых ооцитах метафазные хромосомы прикреплены к веретену деления, а их положение определяется по косвенному признаку – локализации первого полярного тельца (ППТ). Таким образом, после удаления ППТ и части цитоплазмы созревший ооцит утрачивает также и метафазную пластинку (McGrath, Solter, 1983). Проблема данного подхода состоит в миграции ППТ относительно метафазной пластинки (Hardarson et al., 2000; Miao et al., 2004) по причине старения зрелой яйцеклетки (Miao et al., 2009).

Противоположный метод энуклеации заключается в разрезании зоны пеллюцида над ППТ с последующим сжатием ооцита давлением стеклянной иглы для выхода небольшого количества ооплазмы. Извлеченный оопласт остается интактным и, следовательно, удобным для окрашивания ДНК с целью подтверждения удаления веретена деления без подвергания ооцита вредному влиянию ультрафиолетового света. Недостатком процедуры являются ее сложность и слабый контроль объема вытесняемой цитоплазмы. Метод сжатия, связанный с удалением метафазной пластинки посредством выдавливания части цитоплазмы созревшего ооцита свиней *in vitro*, – длительная процедура, характеризующаяся более высокими темпами

дегенерации по сравнению с классическим методом (Lee et al., 2008).

В 2002 г. группа исследователей сообщила о получении клонированных поросят после химической энуклеации (Yin et al., 2002). Химическая энуклеация основана на использовании ингибиторов топоизомеразы II, блокирующих наступление телофазы II, в результате чего веретено деления изгоняется на границу клетки (Fulka, Moor, 1993; Savard et al., 2004). Непродолжительная обработка ооцитов свиней на стадии метафазы II 0.4 мг/мл демеколцина – химического агента-деполимеризатора микротрубочек, в присутствии 0.05 М раствора сахарозы вызывает выпячивание мембраны, содержащее конденсированную хромосомную массу, которая может быть легко удалена посредством аспирации (Kawakami et al., 2003).

Реконструирование ооцитов с целью получения клонированных эмбрионов

Традиционный способ реконструирования подразумевает трансплантацию клетки-донора в перивителлиновое пространство ооцита-реципиента. Соматическую клетку переносят инъекционным капилляром в ооцит после его фиксации на пипетке-присоске через отверстие или разрез, сформированное в ходе энуклеации (Popova et al., 2009). При интрацитоплазматической инъекции кариопласт вводится непосредственно в цитоплазму энуклеированного ооцита, минуя перивителлиновое пространство (Onishi et al., 2000; Lee et al., 2003; Kong et al., 2008). Фактором, ограничивающим применение данного метода получения клонированных эмбрионов, является непонятный механизм разрушения мембраны клетки-донора в цитоплазме ооцита. В случае сохранения целостности мембраны подсаженной клетки и, следовательно, отсутствия репрограммирования ее ядра в ходе процедуры интрацитоплазматической инъекции, эмбрионы в дальнейшем не развиваются (Lee et al., 2003).

Клонированные эмбрионы могут быть получены и без использования микроманипуляционной техники (Vajta et al., 2005). В рамках метода ручного клонирования (handmade cloning – НМС) ооциты на стадии метафазы II освобождают от зоны пеллюцида с помощью фермента проназы, разрезают микроскальпелем на две равные части, которые окрашивают флуоресцентным витальным красителем Hoechst 33342 с целью точного определения нахождения метафазной пластинки. Две половинки ооцитов, не содержащие хроматин, отбирают для слияния с соматической клеткой (Vajta et al., 2001). В литературе имеются сообщения об успешном применении данного метода для получения клонированных поросят (Kragh et al., 2004). Ограничивающим фактором в обеспечении воспроизводимости технологии НМС является необходимость разработки адекватных условий культивирования эмбрионов с удаленной зоной пеллюцида. Использование двух созревших ооцитов для получения одного реконструированного эмбриона методом НМС приводит к потере 50 % исходного материала. Наличие у клонированных эмбрионов НМС до трех генотипов митохондриальной ДНК потенциально увеличивает уровень митохондриальной гетероплазии (Oback et al., 2003).

Развитие клонированного эмбриона невозможно без слияния ооцита-реципиента с подсаженной донорской клеткой. В практике соматического клонирования широкое распространение получила методика слияния цитопласта и кариопласта с использованием явления электропробоя мембран контактирующей пары в импульсном электрическом поле – метод электрослияния. Процедура электрослияния предполагает использование двух типов электрических сигналов – неоднородного переменного электрического поля и прямоугольных импульсов постоянного тока. Электрические колебания, возникающие в ходе процесса электрослияния, вызывают чрезмерное нагревание среды с высокой проводимостью. По этой причине для электрослияния выбирают буферные растворы, обладающие низкой электропроводностью, которые способны вызывать образование диэлектрических потенциалов в пределах клеток для облегчения межклеточного контакта. В основном для слияния клеток используется среда Циммермана в различных модификациях (Robl et al., 1987; Nickoloff, 1995). К физическим факторам, влияющим на эффективность объединения цитопласта и кариопласта, относятся напряжение, продолжительность и повторяемость импульса электрического поля. Как правило, воздействие диэлектрфоретических сил на сливаемые клетки вызывают наведением высокочастотного (1–3 МГц) синусоидального поля переменного тока низкой амплитуды напряженности (~100–300 В/см). Клетки, вступившие в контакт плазматическими мембранами, сливаются одним-двумя прямоугольными импульсами постоянного тока высокого напряжения (1–10 кВ/см) продолжительностью 10–50 мкс (Сао et al., 2008). В литературе описаны разнообразные методы электрослияния клеток, что обусловлено как техническими характеристиками приборов, используемых для этих целей, так и особенностями различных типов клеток.

Активация реконструированных ооцитов

В процессе клонирования энуклеированные ооциты после слияния с диплоидной донорской клеткой активируют к дальнейшему развитию (Campbell, 1999). В клонировании свиней в качестве активационных сигналов применяют импульсы постоянного тока (Im et al., 2004; Hölker et al., 2005), химические агенты иономицин, ионофор Ca^{2+} A23187 (Yin et al., 2002; Hyun et al., 2003; Garcia-Mengual et al., 2008), а также тимерозал в комбинации с дитиотрейтолом (Im et al., 2006; Whitworth et al., 2009). Среди существующих методов наиболее часто для получения клонированных эмбрионов используют электростимуляцию. Сообщается, что величина выброса ионов Ca^{2+} пропорциональна числу и величине пор, образованных в ходе электростимуляции, и зависит от количества и продолжительности электрических импульсов и напряженности электрического поля (Fissore, Robl, 1992). Наложение одного импульса постоянного тока приводит к однократной мобилизации резервов внутриклеточного кальция. Напротив, стратегия множественных электрических импульсов (два-три) стимулирует генерацию длинной серии колебательных пиков Ca^{2+} , во много раз повышая концентрацию этих катионов в ооплазме (Fissore et al., 1999).

В исследованиях по соматическому клонированию свиней умножение электрических импульсов положительно коррелировало с высоким уровнем развития реконструированных ооцитов, до стадии морулы и бластоцисты (Verma et al., 2000; Zhu et al., 2002). Видовой особенностью получения клонированных зигот свиней является одномоментная электроактивация и электрослияние энуклеированного ооцита и соматической клетки донора (Hyun et al., 2003; Lee et al., 2003; Skrzyszowska et al., 2008). Трансгенные клонированные эмбрионы свиней, полученные из ооцитов, которые были реконструированы с использованием фетальных фибробластов, активированных наложением электрических импульсов и последующей инкубацией в растворе иономицина, уступали по показателю развития до стадии бластоцисты ооцитам, сливаемым с соматической клеткой и активируемым одномоментно (Hyun et al., 2003). Одномоментное слияние и активация ооцитов свиней привели к улучшению эмбрионального развития реконструированных с использованием фетальных фибробластов ооцитов свиней по сравнению с использованием совместной электрической и химической активации (Samiec, Skrzyszowska, 2010). При этом надо отметить, что для свиней, в отличие от других видов млекопитающих, к настоящему времени не разработано четких и воспроизводимых унифицированных протоколов электрической активации, а параметры электрического поля (количество электроимпульсов, продолжительность электростимуляции и интервал между импульсами) существенно варьируют (Koo et al., 2005; Cervera et al., 2010; Peng et al., 2013).

Один из подходов к повышению эффективности искусственной активации – применение стимулов, повышающих концентрацию ионов Ca^{2+} в цитоплазме, в комбинации с факторами, подавляющими активность фактора промоции созревания (Presicce, Yang, 1994; Cheng et al., 2007). Электрическая стимуляция совместно с постактивационным культивированием в 6-диметиламинопурине (6-ДМАП) или циклогексимиде приводила к повышению выхода бластоцист по сравнению с обычной электроактивацией (Kim et al., 2005; Im et al., 2006). При культивировании в 6-ДМАП по окончании электростимуляции происходит увеличение колебаний ионов внутриклеточного Ca^{2+} , которое наблюдается на протяжении всего времени постактивации активированных ооцитов свиней (Im et al., 2006, 2007). Комбинация химических агентов 6-ДМАП + цитохалазин Б улучшила партеногенетическое развитие эмбрионов до стадии бластоцисты, однако такие бластоцисты отличались пониженным числом клеток. Постактивация ооцитов свиней в 6-ДМАП повысила выход бластоцист на 7-й день культивирования по сравнению с инкубированием в циклогексимиде или цитохалазине Б (Gruppen et al., 2002).

Культивирование клонированных эмбрионов

Активированные реконструированные ооциты, приступившие к эмбриональному развитию, культивируют *in vitro* в специальных средах до момента пересадки животному-реципиенту. Как известно, при сравнении эмбрионов, полученных *in vivo* и *in vitro*, последние обладают пониженной потенцией к эмбриональному развитию (Uhm

et al., 2009; Gil et al., 2017). В то же время клонированные эмбрионы более чувствительны к условиям культивирования по сравнению с партеногенетическими эмбрионами (Heindryckx et al., 2001). Эти обстоятельства, наряду с повышенной восприимчивостью эмбрионов к факторам окружающей среды при нахождении вне организма свиноматки, в частности температурным колебаниям, обуславливают особые требования к выбору системы *in vitro* культивирования реконструированных ооцитов свиней. Культуральные среды должны обеспечивать преодоление блока развития 4-клеточного эмбриона свиней, активацию собственного генома и развитие *in vitro* до продвинутых стадий эмбриогенеза (морула и бластоциста).

При эмбриональном культивировании у свиней находят свое применение NCSU-23 и NCSU-37, BECM-3, PZM-3, PZM-4 и PZM-5 (Dobrinsky et al., 1996; Yoshioka et al., 2002; Im et al., 2004). NCSU-23 – традиционная и первоначально широко используемая среда для развития оплодотворенных *in vitro* и клонированных эмбрионов свиней. В то же время PZM-3, близкая по своему составу среде яйцевода свиней, позволяет повысить долю эмбрионов, развившихся до стадии бластоцисты на 7-й день культивирования, и число клеток внутриклеточной массы по сравнению с NCSU-23 (Im et al., 2004). Как известно, клонированные эмбрионы более подвержены апоптотической дегенерации по сравнению с эмбрионами, развившимися после *in vitro* оплодотворения интактных ооцитов (Ju et al., 2010). Показано, что культивирование в разработанной японскими исследователями в 2004 г. среде PZM-5 (Suzuki et al., 2004) снижает индекс апоптоза в эмбрионах свиней, полученных методом переноса ядер соматических клеток (Yamanaka et al., 2009).

Однако следует отметить, что, несмотря на локальные успехи в разработке и применении новых культуральных сред, в настоящее время условия культивирования эмбрионов данного вида животных все еще не оптимизированы. Именно по этой причине, как считают ученые из Канады (Cordova et al., 2017), в большинстве экспериментов по переносу ядер соматических клеток реконструированные эмбрионы пересаживают животным-реципиентам до начала или на ранних стадиях дробления. В частности, показана результативность пересадки эмбрионов свиноматке-реципиенту через 4–6 ч после активации реконструированных ооцитов по сравнению с пересадкой уже 1–2-клеточных эмбрионов (20–24 ч), которая выражалась в повышении уровня супоросности и общей эффективности клонирования (Shi et al., 2015). С другой стороны, инкубация *in vitro* до стадии морулы и бластоцисты позволяет контролировать каждое деление–дробление с возможностью отбора самых качественных эмбрионов с наибольшим потенциалом для последующего развития (Jin et al., 2019). В подтверждение данного факта удлинение времени культивирования *in vitro* клонированных эмбрионов с 20 до 40 ч повысило число супоросных реципиентов на 13 %, а с 22 до 120 ч – на 61.8 % (Ju et al., 2010; Rim et al., 2013).

Заключение

Анализ литературных данных показал, что технология клонирования позволяет создавать клонированные эмбрионы свиней и получать жизнеспособное потомство

после пересадки животному-реципиенту. В то время как отдельные этапы клонирования во многом стали рутинными процедурами (слияние, энуклеация, реконструирование), остальные – все еще не детерминированы и требуют проведения дополнительных исследований (созревание ооцитов, культивирование донорских клеток и эмбрионов). Также очевидно, что в дальнейшем следует уделять особое внимание изучению механизмов репрограммирования соматической клетки и регуляции качества ооцитов – источников цитопластов.

Список литературы / References

- Сингина Г.Н., Волкова Н.А., Багиров В.А., Зиновьева Н.А. Криобанки соматических клеток как перспективный способ сохранения генетических ресурсов животных. С.-х. биология. 2014; 6:3-14. DOI 10.15389/agrobiology.2014.6.3rus.
- [Singina G.N., Volkova N.A., Bagirov V.A., Zinovieva N.A. Cryobanking of somatic cells in conservation of animal genetic resources: prospects and successes. Selskokhozyaistvennaya Biologiya = Agricultural Biology. 2014;6:3-14. DOI 10.15389/agrobiology.2014.6.3eng.]
- Bethauser J., Forsberg E., Augenstein M., Childs L., Eilertsen K., Enos J., Forsythe T., Golueke P., Jurgella G., Koppang R., Lesmeister T., Mallon K., Mell G., Misica P., Pace M., Pfister-Genskow M., Strelchenko N., Voelker G., Watt S., Thompson S., Bishop M. Production of cloned pigs from *in vitro* systems. Nat. Biotechnol. 2000; 18:1055-1059. DOI 10.1038/80242.
- Boquest A.C., Day B.N., Prather R.S. Flow cytometric cell cycle analysis of cultured porcine fetal fibroblast cells. Biol. Reprod. 1999;60: 1013-1019. DOI 10.1095/biolreprod60.4.1013.
- Campbell K.H. Nuclear transfer in farm animal species. Semin. Cell Dev. Biol. 1999;10(3):245-252. DOI 10.1006/scdb.1999.0310.
- Campbell K.H., Loi P., Otaegui P.J., Wilmut I. Cell cycle co-ordination in embryo cloning by nuclear transfer. Rev. Reprod. 1996;1(1):40-46. DOI 10.1530/ror.0.0010040.
- Cao Y., Yang J., Yin Z.Q., Luo H.Y., Yang M., Hu N., Yang J., Huo D.Q., Hou C.J., Jiang Z.Z., Zhang R.Q., Xu R., Zheng X.L. Study of high-throughput cell electrofusion in a microelectrode-array chip. Microfluid. Nanofluidics. 2008;5:669-675. DOI 10.1007/s10404-008-0289-1.
- Cervera R.P., Marti-Gutierrez N., Escorihuela E., Moreno R., Stojkovic M. Trichostatin A affects histone acetylation and gene expression in porcine somatic cell nucleus transfer embryos. Theriogenology. 2009;72:10971110. DOI 10.1016/j.theriogenology.2009.06.030.
- Cervera R.P., Silvestre M.A., Marti N., Garcia-Mengual E., Moreno R., Stojkovic M. Effects of different oocyte activation procedures on development and gene expression of porcine pre-implantation embryos. Reprod. Domest. Anim. 2010;45:12-20. DOI 10.1111/j.1439-0531.2009.01509.x.
- Cheng W.M., Sun X.L., An L., Zhu S.E., Li X.H., Li Y., Tian J.H. Effect of different parthenogenetic activation methods on the developmental competence of *in vitro* matured porcine oocytes. Anim. Biotechnol. 2007;18:131-141. DOI 10.1080/10495390601096148.
- Cordova A., King W.A., Mastrodonaco G.F. Choosing a culture medium for SCNT and iSCNT reconstructed embryos: from domestic to wildlife species. J. Anim. Sci. Technol. 2017;59:24. DOI 10.1186/s40781-017-0149-1.
- Dobrinsky J.R., Johnson L.A., Rath D. Development of a culture medium (BECM-3) for porcine embryos: effects of bovine serum albumin and fetal bovine serum on embryo development. Biol. Reprod. 1996;55(5):1069-1074.
- Enright B.P., Kubota C., Yang X., Tian X.C. Epigenetic characteristics and development of embryos cloned from donor cells treated by Trichostatin A or 5-aza-2'-deoxycytidine. Biol. Reprod. 2003;69: 896-901. DOI 10.1095/biolreprod.103.017954.
- Ferreira E.M., Vireque A.A., Adona P.R., Meirelles F.V., Ferriani R.A., Navarro P.A. Cytoplasmic maturation of bovine oocytes: structural

- and biochemical modifications and acquisition of developmental competence. *Theriogenology*. 2009;71:836-848. DOI 10.1016/j.theriogenology.2008.10.023.
- Fissore R.A., Long C.R., Duncan R.P., Robl J.M. Initiation and organization of events during the first cell cycle in mammals: applications in cloning. *Cloning*. 1999;1(2):89-100. DOI 10.1089/15204559950019979.
- Fissore R.A., Robl J.M. Intracellular Ca²⁺ response of rabbit oocytes to electrical stimulation. *Mol. Reprod. Dev.* 1992;32:9-16. DOI 10.1002/mrd.1080320103.
- Fulka J., Moor R.M. Noninvasive chemical enucleation of mouse oocytes. *Mol. Reprod. Dev.* 1993;34:427-430. DOI 10.1002/mrd.1080340412.
- Garcia-Mengual E., Alfonso J., Salvador I., Duque C.C., Silvestre M.A. Oocyte activation procedures and influence of serum on porcine oocyte maturation and subsequent parthenogenetic and nuclear transfer embryo development. *Zygote*. 2008;16:279-284. DOI 10.1017/S0967199408004796.
- Gil M.A., Martinez C.A., Nohalez A., Parrilla I., Roca J., Wu J., Ross P.J., Cuello C., Izpisua J.C., Martinez E.A. Developmental competence of porcine genome-edited zygotes. *Mol. Reprod. Dev.* 2017;84(9):814-821. DOI 10.1002/mrd.22829.
- Gruppen C., Mau J.C., McIlpatrick S.M., Maddocks S., Nottle M.B. Effect of 6-dimethylaminopurine on electrically activated in vitro matured porcine oocytes. *Mol. Reprod. Dev.* 2002;62:387-96. DOI 10.1002/mrd.10126.
- Hardarson T., Lundin K., Hamberger L. The position of the metaphase II spindle cannot be predicted by the location of the first polar body in the human oocyte. *Hum. Reprod.* 2000;15(6):1372-1376. DOI 10.1093/humrep/15.6.1372.
- Heindryckx B., Rybouchkin A., Van Der Elst J., Dhont M. Effect of culture media on *in vitro* development of cloned mouse embryos. *Cloning*. 2001;3(2):41-50. DOI 10.1089/15204550152475545.
- Hölker M., Petersen B., Hassel P., Kues W.A., Lemme E., Lucas-Hahn A., Niemann H. Duration of *in vitro* maturation of recipient oocytes affects blastocyst development of cloned porcine embryos. *Cloning Stem Cells*. 2005;7:35-44. DOI 10.1089/clo.2005.7.35.
- Hyun H., Lee S.E., Son Y.J., Shin M.Y., Park Y.G., Kim E.Y., Park S.P. Cell synchronization by rapamycin improves the developmental competence of porcine SCNT embryos. *Cell. Reprogram.* 2016;18(3):195-205. DOI 10.1089/cell.2015.0090.
- Hyun S., Lee G., Kim D., Kim H., Lee S., Nam D., Jeong Y., Kim S., Yeom S., Kang S., Han J., Lee B., Hwang W. Production of nuclear transfer-derived piglets using porcine fetal fibroblasts transfected with the enhanced green fluorescent protein. *Biol. Reprod.* 2003;69:1060-1068. DOI 10.1095/biolreprod.102.014886.
- Im G.S., Lai L., Liu Z., Hao Y., Wax D., Bonk A., Prather R.S. In vitro development of preimplantation porcine nuclear transfer embryos cultured in different media and gas atmospheres. *Theriogenology*. 2004;61(6):1125-1135. DOI 10.1016/j.theriogenology.2003.06.006.
- Im G.S., Samuel M., Lai L., Hao Y., Prather R.S. Development and calcium level changes in pre-implantation porcine nuclear transfer embryos activated with 6-DMAP after fusion. *Mol. Reprod. Dev.* 2007;74:1158-1164. DOI 10.1002/mrd.20492.
- Im G.S., Seo J.S., Hwang I.S., Kim D.H., Kim S.W., Yang B.C., Yang B.S., Lai L., Prather R.S. Development and apoptosis of preimplantation porcine nuclear transfer embryos activated with different combination of chemicals. *Mol. Reprod. Dev.* 2006;73:1094-1101. DOI 10.1002/mrd.20455.
- Jaenisch R. Nuclear cloning and direct reprogramming: the long and the short path to Stockholm. *Cell Stem Cell*. 2012;11(6):744-747. DOI 10.1016/j.stem.2012.11.005.
- Jin Y., Zhang M., Ju X., Liang S., Xiong Q., Zhao L., Nie X., Hou D., Liu Q., Wang J., Wang C., Li X., Zhang L., Liu X., Wang Y., Yang H., Dai Y., Li R. Factors influencing the somatic cell nuclear transfer efficiency in pigs. *Front. Agr. Sci. Eng.* 2019;6(1):73-83. (2018. Epub ahead of print). DOI 10.15302/J-FASE-2018220.
- Ju S., Rui R., Lu Q., Lin P., Guo H. Analysis of apoptosis and methyltransferase mRNA expression in porcine cloned embryos cultured in vitro. *J. Assist. Reprod. Genet.* 2010;27(1):49-59. DOI 10.1007/s10815-009-9378-7.
- Kawakami M., Tani T., Yabuuchi A., Kobayashi T., Murakami H., Fujimura T., Kato Y., Tsunoda Y. Effect of demecolcine and nocodazole on the efficiency of chemically assisted removal of chromosomes and the developmental potential of nuclear transferred porcine oocytes. *Cloning Stem Cells*. 2003;5(4):379-387. DOI 10.1089/153623003772032871.
- Kim Y.S., Lee S.L., Ock S.A., Balasubramanian S., Choe S.Y., Rho G.J. Development of cloned pig embryos by nuclear transfer following different activation treatments. *Mol. Reprod. Dev.* 2005;70:308-313. DOI 10.1002/mrd.20211.
- Kong Q.R., Luo Y.B., Tian J.T., Wang Z.K., Zhang L., Liu Z.H. Production of porcine reconstructed embryos by whole-cell intracytoplasmic microinjection (Article in Chinese). *Fen Zi Xi Bao Sheng Wu Xue Bao*. 2008;41(1):70-74.
- Koo D.B., Chae J.I., Kim J.S., Wee G., Song B.S., Lee K.K., Han Y.M. Inactivation of MPF and MAP kinase by single electrical stimulus for parthenogenetic development of porcine oocytes. *Mol. Reprod. Dev.* 2005;72:542-549. DOI 10.1002/mrd.20382.
- Kragh P.M., Vajta G., Corydon T.J., Purup S., Bolund L., Callesen H. Production of transgenic porcine blastocysts by hand-made cloning. *Reprod. Fertil. Dev.* 2004;16:315-318. DOI 10.10371/RD04007.
- Kues W.A., Carnwath J.W., Paul D., Niemann H. Cell cycle synchronization of porcine fetal fibroblasts by serum deprivation initiates a nonconventional form of apoptosis. *Cloning Stem Cells*. 2002;4(3):231-243. DOI 10.1089/15362300260339511.
- Lee E., Estrada J., Piedrahita J. Comparative study on the efficiency of two enucleation methods in pig somatic cell nuclear transfer: effects of the squeezing and the aspiration methods. *Anim. Biotechnol.* 2008;19(2):71-79. DOI 10.1080/10495390701839264.
- Lee J.W., Wu S.C., Tian X.C., Barber M., Hoagland T., Riesen J., Lee K.H., Tu C.F., Cheng W.T., Yang X. Production of cloned pigs by whole-cell intracytoplasmic microinjection. *Biol. Reprod.* 2003;69:995-1001. DOI 10.1095/biolreprod.103.015917.
- Liu Y., Zeng B.H., Shang H.T., Cen Y.Y., Wei H. Bama miniature pigs (*Sus scrofa domestica*) as a model for drug evaluation for humans: comparison of in vitro metabolism and in vivo pharmacokinetics of lovastatin. *Comp. Med.* 2008;58:580-587.
- Marteil G., Richard-Parpaillon L., Kubiak J.Z. Role of oocyte quality in meiotic maturation and embryonic development. *Reprod. Biol.* 2009;9(3):203-224. DOI 10.1016/S1642-431X(12)60027-8.
- McGrath J., Solter D. Nuclear transplantation in the mouse embryo by microsurgery and cell fusion. *Science*. 1983;220:1300-1302. DOI 10.1002/jez.1402280218.
- Miao Y.L., Kikuchi K., Sun Q.Y., Schatten H. Oocyte aging: cellular and molecular changes, developmental potential and reversal possibility. *Hum. Reprod. Update*. 2009;15(5):573-585. DOI 10.1093/humupd/dmp014.
- Miao Y., Ma S., Liu X., Miao D., Chang Z., Luo M., Tan J. Fate of the first polar bodies in mouse oocytes. *Mol. Reprod. Dev.* 2004;69:66-76. DOI 10.1002/mrd.20148.
- Nickoloff J.A. (Ed.) *Animal Cell Electroporation and Electrofusion Protocols*. In: Ser. "Methods in Molecular Biology". Vol. 48. Totowa, NJ: Humana Press, 1995.
- Niemann H., Kues W.A., Lucas-Hahn A., Carnwath J.W. Somatic cloning and epigenetic reprogramming in mammals. In: Atala A., Lanza R., Thompson J., Norem R. (Eds.) *Principles in Regenerative Medicine*. 2nd edn. Academic Press, 2011:148-167.
- Oback B., Wiersema A.T., Gaynor P., Laible G., Tucker F.C., Oliver J.E., Miller A.L., Troskie H.E., Wilson K.L., Forsyth J.T., Berg M.C., Cockrem K., McMillan V., Tervit H.R., Wells D.N. Cloned cattle derived from a novel zona-free embryo reconstruction system. *Cloning Stem Cells*. 2003;5(1):3-12. DOI 10.1089/153623003321512111.
- Onishi A., Iwamoto M., Akita T., Mikawa S., Takeda K., Awata T., Hanada H., Perry A.C. Pig cloning by microinjection of fetal fibro-

- blast nuclei. *Science*. 2000;289:1188-1190. DOI 10.1126/science.289.5482.1188.
- Park H.J., Koo O.J., Kwon D.K., Kang J.T., Jang G., Lee B.C. Effect of roscovitine-treated donor cells on development of porcine cloned embryos. *Reprod. Domest. Anim.* 2010;45(6):1082-1088. DOI 10.1111/j.1439-0531.2009.01499.x.
- Peng H., Liu F.J., Zhang X.F., Zhuang Y.F., Wang X.A., Li H.X., Hong Z.Y., Lin X.J., Zhang W.C. Study of electro-fusion/activation in somatic cell nuclear transfer to obtain cloned putian black pig embryos. *J. Anim. Vet. Adv.* 2013;12(4):497-503. DOI 10.3923/javaa.2013.497.503.
- Polejaeva I.A., Chen S.H., Vaught T.D., Page R.L., Mullins J., Ball S., Dai Y., Boone J., Walker S., Ayares D.L., Colman A., Campbell K.H. Cloned pigs produced by nuclear transfer from adult somatic cells. *Nature*. 2000;407:8690. DOI 10.1038/35024082.
- Popova E., Bader M., Krivokharchenko A. Efficient production of nuclear transferred rat embryos by modified methods of reconstruction. *Mol. Reprod. Dev.* 2009;76:208-216. DOI 10.1002/mrd.20944.
- Presicce G.A., Yang X.Z. Parthenogenetic development of bovine oocytes matured in vitro for 24 hr and activated by ethanol and cycloheximide. *Mol. Reprod. Dev.* 1994;38:380-385. DOI 10.1002/mrd.1080380405.
- Rim C.H., Fu Z., Bao L., Chen H., Zhang D., Luo Q., Ri H.C., Huang H., Luan Z., Zhang Y., Cui C., Xiao L., Jong U.M. The effect of the number of transferred embryos, the interval between nuclear transfer and embryo transfer, and the transfer pattern on pig cloning efficiency. *Anim. Reprod. Sci.* 2013;143(1-4):91-96. DOI 10.1016/j.anireprosci.2013.10.004.
- Robl J.M., Prather R.S., Branes F., Eyestone W., Northey D., Gilligan B., First N.L. Nuclear transplantation in bovine embryos. *J. Anim. Sci.* 1987;64:642-647.
- Samiec M., Skrzyszowska M. The use of different methods of oocyte activation for generation of porcine fibroblast cell nuclear transferred embryos. *Ann. Anim. Sci.* 2010;10(4):399-411.
- Savard C., Novak S., Saint-Cyr A., Moreau M., Pothier F., Sirard M.A. Comparison of bulk enucleation methods for porcine oocytes. *Mol. Reprod. Dev.* 2004;67(1):70-76. DOI 10.1002/mrd.20011.
- Shi J., Zhou R., Luo L., Mai R., Zeng H., He X., Liu D., Zeng F., Cai G., Ji H., Tang F., Wang Q., Wu Z., Li Z. Influence of embryo handling and transfer method on pig cloning efficiency. *Anim. Reprod. Sci.* 2015;154:121-127. DOI 10.1016/j.anireprosci.2015.01.006.
- Simões R., Santos A.R., Jr. Factors and molecules that could impact cell differentiation in the embryo generated by nuclear transfer. *Organogenesis*. 2017;13(4):156-178. DOI 10.1080/15476278.2017.1389367.
- Skrzyszowska M., Samiec M., Słomski R., Lipiński D., Mały E. Development of porcine transgenic nuclear-transferred embryos derived from fibroblast cells transfected by the novel technique of nucleofection or standard lipofection. *Theriogenology*. 2008;70:248-259. DOI 10.1016/j.theriogenology.2008.04.007.
- Sugimura S., Yamanaka K., Kawahara M., Wakai T., Yokoo M., Sato E. Early metaphase II oocytes treated with dibutyl cyclic adenosine monophosphate provide suitable recipient cytoplasm for the production of miniature pig somatic cell nuclear transfer embryos. *Anim. Sci. J.* 2010;81(1):48-57. DOI 10.1111/j.1740-0929.2009.00705.x.
- Suzuki C., Iwamura S., Yoshioka K. Birth of piglets through the non-surgical transfer of blastocysts produced *in vitro*. *Reprod. Dev.* 2004;50(4):487-491.
- Tatham B.G., Dowsing A.T., Trounson A.O. Enucleation by centrifugation of *in vitro*-matured bovine oocytes for use in nuclear transfer. *Biol. Reprod.* 1995;53:1088-1094. DOI 10.1095/biolreprod53.5.1088.
- Uhm S.J., Gupta M.K., Chung H.J., Kim J.H., Park C., Lee H.T. Relationship between developmental ability and cell number of Day 2 porcine embryos produced by parthenogenesis or somatic cell nuclear transfer. *Asian-Australas. J. Anim. Sci.* 2009;22(4):483-491. DOI 10.5713/ajas.2009.80362.
- Vacková I., Engelová M., Marinov I., Tománek M. Cell cycle synchronization of porcine granulosa cells in G1 stage with mimosine. *Anim. Reprod. Sci.* 2003;77(3-4):235-245. DOI 10.1016/S0378-4320(03)00034-4.
- Vajta G., Kragh P.M., Mtango N.R., Callesen H. Hand-made cloning approach: potentials and limitations. *Reprod. Fertil. Dev.* 2005;17(1-2):97-112. DOI 10.1071/RD04116.
- Vajta G., Lewis I.M., Hyttel P., Thouas G., Trounson A. Somatic cell cloning without micromanipulators. *Cloning*. 2001;3:89-95. DOI 10.1089/15204550152475590.
- Verma P.J., Du Z.T., Crocker L., Faast R., Grupen C.G., McIlfatrick S.M., Ashman R.J., Lyons I.G., Nottle M.B. In vitro development of porcine nuclear transfer embryos constructed using fetal fibroblasts. *Mol. Reprod. Dev.* 2000;57(3):262-226. DOI 10.1002/1098-2795(200011)57:3<262::AID-MRD8>3.0.CO;2-X.
- Whitworth K.M., Li R., Spate L.D., Wax D.M., Rieke A., Whyte J.J., Manandhar G., Sutovsky M., Green J.A., Sutovsky P., Prather R.S. Method of oocyte activation affects cloning efficiency in pigs. *Mol. Reprod. Dev.* 2009;76:490-500. DOI 10.1002/mrd.20987.
- Wilmot I., Schnieke A.E., McWhir J., Kind A.J., Campbell K.H. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature*. 1997;385:810-813. DOI 10.1089/clo.2006.0002.
- Wimmers K., Murani E., Ponsuksili S. Functional genomics and genetical genomics approaches towards elucidating networks of genes affecting meat performance in pigs. *Brief. Funct. Genomics*. 2010;9:251-258. DOI 10.1093/bfgp/elq003.
- Yamanaka K., Sugimura S., Wakai T., Kawahara M., Sato E. Difference in sensitivity to culture condition between *in vitro* fertilized and somatic cell embryos in pigs. *Reprod. Dev.* 2009;55(3):299-304. DOI 10.1262/jrd.20174.
- Yang F., Hao R., Kessler B., Brem G., Wolf E., Zakhartchenko V. Rabbit somatic cell cloning: effects of donor cell type, histone acetylation status and hymeric embryo-complementation. *Reproduction*. 2007;133(1):219-230. DOI 10.1530/rep.1.01206.
- Yin X.J., Tani T., Yonemura I., Kawakami M., Miyamoto K., Hasegawa R., Kato Y., Tsunoda Y. Production of cloned pigs from adult somatic cells by chemically assisted removal of maternal chromosomes. *Biol. Reprod.* 2002;67:442-446. DOI 10.1095/biolreprod.67.2.442.
- Yoshioka K., Suzuki C., Tanaka A., Anas I.M., Iwamura S. Birth of piglets derived from porcine zygotes cultured in a chemically defined medium. *Biol. Reprod.* 2002;66(1):112-119.
- Zhang Y., Pan D., Sun X., Sun G., Wang X., Liu X., Li Y., Dai Y., Li N. Production of porcine cloned transgenic embryos expressing green fluorescent protein by somatic cell nuclear transfer. *Sci. China C. Life Sci.* 2006;49(2):164-171. DOI 10.1007/s11427-005-0071-5.
- Zheng Y.M., Zhao H.Y., Zhao X.E., Quan F.S., Hua S., He X.Y., Liu J., He X.N., Lin H. Development of cloned embryos from porcine neural stem cells and amniotic fluid-derived stem cells transfected with enhanced green fluorescence protein gene. *Reproduction*. 2009;137(5):793-801. DOI 10.1530/REP-08-0469.
- Zhu J., Telfer E.E., Fletcher J., Springbett A., Dobrinsky J.R., De Sousa P.A., Wilmot I. Improvement of an electrical activation protocol for porcine oocytes. *Biol. Reprod.* 2002;66(3):635-641. DOI 10.1095/biolreprod66.3.635.

ORCID ID

A.V. Lopukhov orcid.org/0000-0002-1284-1486
G.N. Singina orcid.org/0000-0003-0198-9757
N.A. Zinovieva orcid.org/0000-0003-4017-6863

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 05.02.2019. После доработки 20.05.2019. Принята к публикации 20.05.2019.