

DOI: <https://doi.org/10.17816/gc638127>

Влияние цитохалазина Б в период подготовки цитопластов на эффективность соматического клонирования овец (*Ovis aries*)

А.В. Лопухов, Е.Н. Шедова, Е.В. Цындринна, Г.Н. Сингина

Федеральный исследовательский центр животноводства — ВИЖ имени академика Л.К. Эрнста, Московская область, городской округ Подольск, посёлок Дубровицы, Россия

АННОТАЦИЯ

Обоснование. Соматическое клонирование овец представляет большой интерес с точки зрения сохранения генетических ресурсов, биомедицины и биофармацевтики, но его эффективность остаётся крайне низкой. Способом повышения результативности этой технологии является оптимизация её отдельных этапов, в частности процедуры энуклеации ооцитов и переноса в перивителлиновое пространство полученных цитопластов соматической клетки (СК) — nuclear transfer (NT). Химический агент цитохалазин Б повышает устойчивость ооцита к внешним деформациям и облегчает проведение микроманипуляций. Однако вопрос его использования в технологии клонирования остаётся дискуссионным.

Цель исследования — оценить эффективность соматического клонирования овец (*Ovis aries*) при использовании цитохалазина Б в период подготовки созревших ооцитов перед NT в зависимости от продолжительности данной процедуры.

Материалы и методы. Для NT использовали ооциты, созревшие *in vitro* и имеющие в своем перивителлиновом пространстве первое полярное тельце (ППТ). Первую группу ооцитов с ППТ перед процедурой NT инкубировали в течение 20 мин в среде, содержащей 7,5 мкг/мл цитохалазина Б (опыт); другая часть их хранилась в среде аналогичного состава в отсутствие цитохалазина Б (контроль). NT выполняли с использованием инвертированного микроскопа, совмещённого с микроманипуляционной системой Narishige (Narishige Scientific Inst. Lab., Япония). Хромосомы яйцеклетки удаляли вслепую аспирацией ППТ и прилежащей к нему части цитоплазмы. СК инъецировали непосредственно в перивителлиновое пространство энуклеированного ооцита. Электрослияние являлось способом объединения комплексов ооцит–СК. Образовавшиеся в результате электрического воздействия цитогриды активировали иономицином, подвергали одновременной обработке 6-(диметиламино)пурином и циклогексимидом, после чего культивировали в течение 2 дней для эмбрионального развития.

Результаты. Результативность NT (количество комплексов ооцит–СК относительно числа ооцитов с ППТ) и уровень слияния (количество образовавшихся цитогридов относительно числа комплексов ооцит–СК) не различались между контрольной и опытной группами и находились на уровне 96–97 и 33–35% соответственно. В контрольной группе доля раздробившихся цитогридов после 2 дней культивирования составила $35,7 \pm 7,7\%$. Предварительная инкубация ооцитов в присутствии цитохалазина Б повышала данный показатель до $59,7 \pm 6,9\%$ ($p < 0,0029$). Влияние обработки ооцитов цитохалазином Б на показатели эффективности клонирования, тем не менее, зависело от длительности NT: наблюдалось снижение уровня слияния ($p = 0,002$) и уменьшение доли клонированных эмбрионов (от числа комплексов ооцит–СК) в случае превышения продолжительности процедуры более 40 мин ($p = 0,041$).

Заключение. Кратковременное культивирование созревших ооцитов в присутствии цитохалазина Б перед процедурой NT повышает выход клонированных эмбрионов, при этом увеличение продолжительности данной процедуры оказывает негативный эффект на показатели результативности соматического клонирования овец.

Ключевые слова: овца; соматическое клонирование; ооцит; цитохалазин Б; слияние; эмбриональное развитие.

Как цитировать:

Лопухов А.В., Шедова Е.Н., Цындринна Е.В., Сингина Г.Н. Влияние цитохалазина Б в период подготовки цитопластов на эффективность соматического клонирования овец (*Ovis aries*) // Гены и клетки. 2025. Т. 20, № 1. С. 31–40. DOI: <https://doi.org/10.17816/gc638127>

DOI: <https://doi.org/10.17816/gc638127>

The effect of cytochalasin B during cytoplasm preparation on the efficiency of somatic cloning in sheep (*Ovis aries*)

Alexandr V. Lopukhov, Ekaterina N. Shedova, Evgeniya V. Tsyndrina, Galina N. Singina

Federal Research Center for Animal Husbandry named after Academy Member L.K. Ernst, Village Dubrovitsy, Podolsk, Moscow Region, Russia

ABSTRACT

BACKGROUND: Somatic cloning of sheep is of great interest for genetic resource conservation, biomedicine, and biopharmaceuticals. However, its efficiency remains extremely low. One way to enhance the efficiency of this technology is to optimize its individual steps, particularly the procedure of oocyte enucleation and the transfer of somatic cell–derived cytoplasm into the perivitelline space — nuclear transfer. The chemical agent cytochalasin B enhances the oocyte’s resistance to external deformation and facilitates micromanipulation procedures. However, its application in cloning technology remains a subject of debate.

AIM: To evaluate the efficiency of somatic cloning in sheep (*Ovis aries*) using cytochalasin B during the preparation of matured oocytes prior to nuclear transfer, depending on the duration of this procedure.

MATERIALS AND METHODS: Nuclear transfer was performed using *in vitro*–matured oocytes containing a first polar body (PB1) in their perivitelline space. In the experimental group, oocytes with PB1 were incubated for 20 minutes in a medium containing 7.5 µg/mL cytochalasin B before nuclear transfer. The control group was maintained in an identical medium without cytochalasin B. Nuclear transfer was conducted using an inverted microscope equipped with a Narishige micromanipulation system (Narishige Scientific Inst. Lab., Japan). Oocyte chromosomes were removed blindly by aspirating the PB1 and the adjacent cytoplasm. Somatic cells were injected directly into the perivitelline space of the enucleated oocyte. Electrofusion was used to combine the oocyte–somatic cell complexes. The cytoplasmic hybrids formed as a result of electrical stimulation were activated using ionomycin, subjected to simultaneous treatment with 6-(dimethylamino)purine and cycloheximide, and then cultured for two days for embryonic development.

RESULTS: The nuclear transfer efficiency (the number of oocyte–somatic cell complexes relative to the number of oocytes with PB1) and fusion rate (the number of cytoplasmic hybrids formed relative to the number of oocyte–somatic cell complexes) did not differ between the control and experimental groups, remaining at 96%–97% and 33%–35%, respectively. In the control group, the proportion of cytoplasmic hybrids undergoing cleavage after two days of culture was $35.7 \pm 7.7\%$. Pre-incubation of oocytes in cytochalasin B increased this parameter to $59.7 \pm 6.9\%$ ($p < 0.0029$). However, the effect of cytochalasin B treatment on cloning efficiency depended on the duration of nuclear transfer: when the procedure exceeded 40 minutes, a significant decrease in the fusion rate ($p = 0.002$) and a reduction in the proportion of cloned embryos (relative to the number of oocyte–somatic cell complexes) ($p = 0.041$) were observed.

CONCLUSION: Short-term culture of matured oocytes in the presence of cytochalasin B before nuclear transfer increases the yield of cloned embryos, while prolonged nuclear transfer procedures negatively affect the efficiency of somatic cloning in sheep.

Keywords: sheep; somatic cloning; oocyte; cytochalasin B; fusion; embryonic development.

To cite this article:

Lopukhov AV, Shedova EN, Tsyndrina EV, Singina GN. The effect of cytochalasin B during cytoplasm preparation on the efficiency of somatic cloning in sheep (*Ovis aries*). *Genes & cells*. 2025;20(1):31–40. DOI: <https://doi.org/10.17816/gc638127>

Received: 25.10.2024

Accepted: 02.12.2024

Published online: 02.03.2025

ВВЕДЕНИЕ

Соматическое клонирование (somatic cell nuclear transfer, SCNT) — это мощный биотехнологический инструмент, направленный на сохранение высокоценных генотипов и ускорение генетического прогресса в животноводстве, получение животных с редактированным геномом и поддержание видовой разнообразия [1–4]. Не менее важное значение имеет клонирование животных в биомедицинских целях, которое обуславливает перспективы разработки более точных методов моделирования и терапии заболеваний человека, улучшения и ускорения тестирования лекарственных препаратов, а также проведения ксенотрансплантации [5–7]. Овца является удобным объектом для биомедицинских исследований. SCNT в комбинации с методами геномной инженерии открывает новые возможности для геномного редактирования овец, а также для производства необходимых человеку биологически активных веществ, в частности фармацевтических рекомбинантных белков, секретлируемых в молоко, и моноклональных антител [8–10].

К сожалению, в настоящее время практические преимущества получения клонированных животных, в том числе овец, в большей степени нивелируются высокой себестоимостью и низкой эффективностью процедуры SCNT, которая требует усовершенствования и повышения воспроизводимости результатов [11–13]. В качестве потенциальных возможностей для улучшения результативности SCNT рассматривают стандартизацию оценки качества ооцитов перед постановкой на созревание, оптимизацию параметров слияния энуклеированного ооцита и перенесённой в него соматической клетки (СК), а также условий репрограммирования донорского ядра в цитоплазме ооцита-реципиента и культивирования полученных цитогрибидов [14–17].

Основопологающий принцип технологии клонирования заключается в удалении собственного ядра у созревшего ооцита (энуклеация) и в замене его на ядро СК, содержащее генетическую информацию только донорского организма [18]. Как правило, ооциты лишают ядерного материала, используя классический метод слепой энуклеации, который предполагает аспирацию первого полярного тельца (ППТ) и части прилежащей ооплазмы с метафазными хромосомами [19, 20]. В процессе энуклеации интактный ооцит проходит испытание на сохранение своей целостности, жизнеспособности и потенции к эмбриональному развитию [21, 22]. Микроманипуляции, связанные с удалением и переносом ядерного материала (прокол оболочек, биопсия ооплазмы, посадка донорской клетки), являются стрессом для ооцита и могут приводить к его дегенерации, в том числе вследствие необратимых повреждений плазматической мембраны и лизиса содержимого [23, 24]. Процедура энуклеации и переноса в перивителлиновое пространство полученного цитопласта СК, которую в англоязычных публикациях определяют как перенос ядра (nuclear transfer,

NT), может быть также сопряжена с утратой и разрушением части клеточных компартментов, ультраструктур и молекулярных факторов ооцита, необходимых для последующего развития [25–27]. Вследствие вышесказанного для повышения эффективности SCNT важное значение приобретает поиск решений по повышению устойчивости ооцита к механическим воздействиям в ходе микроманипуляций [28].

Одним из основных компонентов цитоскелета ооцита являются субъединицы белка актина, полимеризованные в форме двухцепочечных спиральных нитей — микрофиламентов [29]. Актиновые микрофиламенты накапливаются в кортексе в период цитоплазматического созревания и к наступлению стадии метафазы второго деления мейоза (MII) уже полностью пронизывают кортикальный слой [30, 31]. Микрофиламенты тесно связаны с оолеммой и обеспечивают прочность цитоскелета ооцита [32].

Цитофармакологический агент цитохалазин Б, продукт метаболизма плесневых грибов, может воздействовать на актиновые микрофиламенты, вызывая их деполимеризацию [33]. Разрушение полимерных актиновых нитей изменяет физические свойства цитоплазмы ооцитов, снижает жёсткость и повышает эластичность плазматической мембраны [34]. Цитохалазин Б стабилизирует цитоскелет ооцита, предотвращая его структурные повреждения и облегчая реконструирование [35]. Цитохалазин Б в настоящее время широко используется в клонировании млекопитающих, в том числе в ходе NT [36–39]. Однако вопрос о целесообразности применения данного химического агента с этой целью всё ещё остаётся открытым. Есть данные, что NT ооцитов крупного рогатого скота, овец и свиней может проводиться без его участия [40–42]. В некоторых случаях использование цитохалазина Б приводило к ухудшению развития клонированных эмбрионов домашних животных [32, 42].

Цель исследования — оценить эффективность SCNT овец (*Ovis aries*) при использовании цитохалазина Б в период подготовки созревших ооцитов перед NT в зависимости от продолжительности данной процедуры.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Во всех экспериментах, за исключением отдельных указанных случаев, использовали реактивы производства Sigma-Aldrich (США). Культивирование ооцитов, СК и эмбрионов осуществляли при температуре 38,5 °С в атмосфере с 5% CO₂. Вне инкубатора все манипуляции с данными объектами проводили при 37 °С.

Подготовка донорских клеток (кариопластов)

Для работы была использована среда DMEM (Dulbecco's modified eagle medium) (Gibco, США) в следующих модификациях:

- дополненная 15% фетальной бычьей сыворотки (ФБС), 50 мкг/мл гентамицина, 1% незаменимых аминокислот (DMEM-P);

- дополненная 5% ФБС и 50 мкг/мл гентамицина (DMEM-M).

Донорскими клетками служили фетальные фибробласты овец IV–V пассажа. За несколько дней до NT клетки размораживали в водяной бане при 37 °С, содержимое переносили в центрифужную пробирку с 10 мл DMEM-M и центрифугировали при 1500 об./мин. После этого клетки культивировали в DMEM-P до завершения формирования монослоя, проводили смену среды на такую же аналогичного состава, но с содержанием 0,5% ФБС, и дополнительно культивировали ещё в течение 48 ч для остановки клеточного цикла фетальных фибробластов на стадии G0/G1. После окончания периода инкубации в условиях сывороточного голодания, которое совпадало с началом эксперимента по NT, готовили суспензию клеток согласно протоколу, описанному ранее [43]. Кратко: среду, в которой происходило культивирование фетальных фибробластов, заменяли раствором трипсина–ЭДТА (Gibco, США), инкубировали при 37 °С до открепления клеток со дна культуральной посуды, после чего фетальные фибробласты переносили в пробирки со средой TC-199, дополненной 50 мкг/мл гентамицина и 0,3% бычьего сывороточного альбумина. Клетки осаждали путём центрифугирования при 300 g в течение 7 мин, супернатант удаляли, а осадок ресуспендировали в среде аналогичного состава до использования при NT.

Подготовка ооцитов (цитопластов)

Источником ооцитов служили яичники овец, доставленные из пункта убоя в физиологическом растворе при температуре 30–35 °С в течение 2,5–3 ч. Препарирование яичников, выделение из них ооцитов в составе ооцит-кумулясных комплексов, селекцию пригодных для культивирования ооцит-кумулясных комплексов и их инкубацию с целью созревания (*in vitro* maturation, IVM) проводили по ранее описанному протоколу [44].

Через 19–23 ч IVM ооциты освобождали от клеток кумулюса, после чего выполняли селекцию тех, которые достигли стадии MII мейоза (созрели *in vitro*), т.е. имели в своём перивителлиновом пространстве ППТ, и тех, в которых отсутствовали признаки дегенерации и лизиса [45]. Первую группу отобранных ооцитов с ППТ перед процедурой NT инкубировали в течение 20 мин в среде, содержащей 7,5 мкг/мл цитохалазина Б (опыт); другая часть хранилась в среде аналогичного состава в отсутствие цитохалазина Б (контроль). Средой культивирования служила TC-199, дополненная 10% ФБС и 50 мкг/мл гентамицина.

Процедура NT: энуклеация ооцитов и перенос в перивителлиновое пространство полученных цитопластов соматических клеток

Микрохирургические процедуры с клетками выполняли с помощью инвертированного микроскопа Nikon Eclipse Ti (Nikon, Япония), совмещённого с системой лево- и правосторонних манипуляторов грубой (механические)

и точной (масляно-гидравлические) настройки Narishige (Япония), а также используя масляно-гидравлические инжекторы. Для NT ооциты в количестве 15–20 клеток помещали в капли среды TC-199 с 5% ФБС объёмом 15 мкл, нанесённые на дно чашки Петри диаметром 60 мм («Биомедикал», Россия) и покрытые лёгким минеральным маслом. В те же капли вносили по 1–2 мкл суспензии фетальных фибробластов. Удаление ППТ и перенос единичных фибробластов проводили, используя микропипетку с внутренним диаметром 13–15 мкм (Origio, США). Ооциты фокусировали с помощью удерживающей пипетки (Origio, США) в поле зрения микроскопа в положении, позволяющем чётко визуализировать ППТ в перивителлиновом пространстве ооцита в направлении на 1 или 5 ч условного циферблата. Микропипетку для биопсии подводили вплотную к оболочке ооцитов, прокалывали zona pellucida в месте локализации ППТ, хромосомы яйцеклетки удаляли вслепую аспирацией ППТ и 10–20% прилегающей цитоплазмы. СК инъецировали в перивителлиновое пространство зафиксированного ооцита микропипеткой, используемой ранее для биопсии ППТ, через отверстие, сформированное в процессе энуклеации. По окончании микроманипуляций определяли результативность NT, проводя отбор морфологически нормальных (без признаков лизиса) комплексов ооцит–СК и расчёт их количества относительно общего числа ооцитов с ППТ, использованных для NT.

Получение цитогридов, их активация и постактивационное культивирование

С целью интеграции содержимого СК в ооцит отобранные клеточные комплексы подвергали электрослиянию, используя мультипоратор фирмы Eppendorf (Германия), по методике, описанной нами ранее [45]. Клеточные комплексы размещали между электродами камеры, заполненной буфером, выравнивали с помощью тонкого стеклянного капилляра и располагали таким образом, чтобы блестящая оболочка ооцита примыкала к одному из электродов, а СК находилась рядом с местом их контакта. Объединение ооцита и СК в цитогриды проводили, используя импульсы постоянного тока. После выполнения электрослияния комплексы хранили в среде TC-199, содержащей 10% ФБС, в условиях инкубатора. Через 60 мин инкубации отбирали образовавшиеся цитогриды, которые идентифицировали по отсутствию донорской клетки в перивителлиновом пространстве ооцита. Неслившиеся комплексы подвергали повторному электрическому воздействию. Результативность слияния оценивали по количеству образовавшихся цитогридов к общему числу использованных комплексов ооцит–СК.

Цитогриды, полученные в результате электрослияния, обрабатывали иономицином в дозе 5 мМ в течение 5 мин, помещали в среду эмбрионального развития, дополненную 2 мМ 6-(диметиламино)пурина и 10 мкг/мл циклогексимида, и инкубировали в течение 4 ч. Для эмбрионального

развития активированные клетки культивировали в среде аналогичного состава в отсутствие данных веществ ещё двое суток [45], после чего определяли количество раздробившихся цитогридов, его долю от числа полученных цитогридов, а также его отношение к исходному количеству комплексов ооцит–СК.

Статистический анализ данных

Статистическую обработку данных проводили при помощи лицензионного программного пакета SigmaStat 2.03.0 (Systat Software Inc., США). Число независимых опытов в каждой экспериментальной группе было не менее 9. Результаты выражали как средние значения (M) и стандартные ошибки средних ($\pm SEM$). Проверку нормальности распределения производили с помощью критерия согласия Колмогорова–Смирнова. Для оценки статистической значимости различий между сравниваемыми средними значениями использовали t -критерий Стьюдента, при этом был принят порог значимости $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Этап проведения NT у овец иллюстрирует рис. 1. Экспериментальные данные оценки показателей результативности NT (количество морфологически нормальных комплексов ооцит–СК относительно числа ооцитов с ППТ), слияния и дробления в зависимости от использования (опыт) или неиспользования (контроль) цитохалазина Б в период подготовки созревших ооцитов к процедуре NT представлены в табл. 1. На данном этапе исследования реконструировано всего 520 ооцитов с ППТ. Результативность NT не различалась между сравниваемыми группами и находилась на высоком уровне. Ооциты, обработанные цитохалазином Б и реконструированные без его использования, также статистически значимо не различались по формированию цитогридов (ооцитов после удаления ядра и слияния с СК). В свою очередь доля раздробившихся цитогридов на 2-й день эмбрионального культивирования, рассчитанная от числа энуклеированных ооцитов, слившихся с СК, в группе цитохалазина Б оказалась существенно — на 22,0% — выше по сравнению с контрольной группой ($p=0,0029$). Положительный эффект сохранялся и в случае, когда выход эмбрионов ранних стадий развития рассчитывали относительно количества комплексов ооцит–СК. В контроле данный показатель составил $12,1 \pm 3,2\%$, в опытной группе — $20,8 \pm 2,6\%$ и был статистически значимо выше ($p=0,041$).

Эффект цитохалазина Б на результативность SCNT был также изучен в контексте продолжительности процедуры NT. Сравнивали две экспериментальные группы: в первой ооциты с ППТ после кратковременного культивирования в присутствии данного агента подвергались процедуре NT в течение периода, не превышающего 40 мин; во второй на микроманипуляции уходило более 40 мин (но не более 50 мин). Результаты данного эксперимента представлены

в табл. 2. Доля комплексов энуклеированный ооцит–СК с отсутствием признаков дегенерации статистически значимо не различалась между вариантами и находилась, как и в первой серии экспериментов, на высоком уровне. В то же время эффективность слияния зависела от длительности NT: доля образовавшихся цитогридов относительно числа комплексов ооцит–СК при продолжительности процедуры более 40 мин была статистически значимо ($p=0,002$) ниже — на 18,8% — по сравнению со случаями, когда процедура длилась менее 40 мин. Влияния длительности NT на компетенцию полученных цитогридов к дроблению и эмбриональному развитию не выявлено, но более низкое количество цитогридов в группе с продолжительностью NT >40 мин на слияние стало причиной снижения выхода эмбрионов ранних стадий развития, рассчитанного относительно количества комплексов ооцит–СК. В группе >40 мин данный показатель составил $13,6 \pm 3,5\%$, в группе ≤ 40 мин он составил $23,0 \pm 2,5\%$ и был статистически значимо выше ($p=0,042$).

ОБСУЖДЕНИЕ

Основным ограничением широкого применения SCNT у домашних животных, в том числе у овец, остаётся низкая эффективность, которая в том числе обусловлена сложностью и многоступенчатостью технологии [46]. Одной из стратегий повышения результативности SCNT является использование агентов, позволяющих уменьшить дегенерацию ооцитов и сохранить их потенцию к последующему развитию.

Для процедуры NT в основном используют ооциты на стадии MII [20]. Во время энуклеации под действием давления пипетки ооцит претерпевает повреждения вследствие локального разрыва плазматической мембраны и утраты части цитоплазмы [47]. Цитохалазин Б благодаря своей функции обратимого ингибирования полимеризации микрофиламентов может усиливать текучесть ооплазмы и пластичность оболочек ооцитов, уменьшая их общую травматичность при проведении микроманипуляций [48]. При этом вопрос его применения относительно процедуры NT остаётся дискуссионным.

Длительность удаления ядра ооцита на стадии MII и переноса ядра СК среди прочих факторов зависит от выбора стратегии NT: например, частичное рассечение зона pellucida всех ооцитов с последующей энуклеацией и подсадкой СК; прокол блестящей оболочки с энуклеацией всей группы ооцитов и отложенной трансплантацией ядер СК; перенос СК в ооцит сразу после удаления ядра; слепая энуклеация или энуклеация под контролем ультрафиолетового света. В наших экспериментах время проведения процедуры NT составляло для 15–20 ооцитов от 20 до 50 мин, что сопоставимо с данными зарубежных исследований, согласно которым в рамках слепого метода энуклеация 30 ооцитов в среднем занимает около 30 мин, а инъекция СК — 20–30 мин [47, 49].

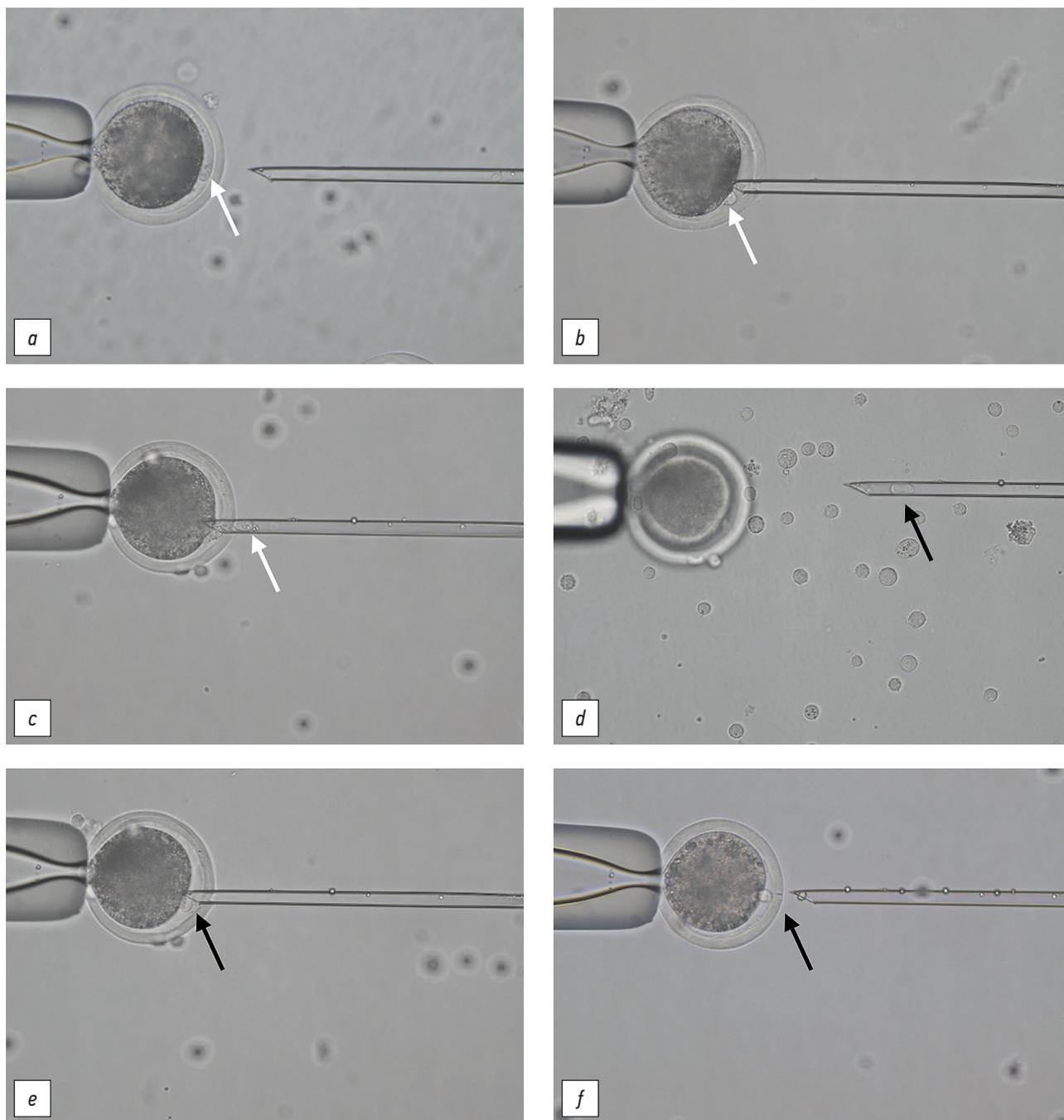


Рис. 1. Микрофотографии ооцитов овец в период проведения процедуры NT (энуклеации ооцитов и переноса в перивителлиновое пространство полученных цитопластов донорской соматической клетки): *a* — индивидуальное фиксирование ооцита с помощью удерживающей пипетки в поле зрения микроскопа в положении, позволяющем чётко визуализировать первое полярное тельце (ППТ); *b–c* — энуклеация ооцита; *d* — захват соматической клетки (СК) микропипеткой; *e* — перенос СК в перивителлиновое пространство энуклеированного ооцита; *f* — завершение процедуры NT: получение комплекса ооцит–СК. Микроскоп Eclipse Ti-U (Nikon, Япония). ППТ указаны белыми стрелками, СК — чёрными стрелками; $\times 200$.

Fig. 1. Micrographs of sheep oocytes during the nuclear transfer procedure: *a*, individual fixation of the oocyte using a holding pipette within the microscope's field of view, positioned to clearly visualize the first polar body (PB1); *b–c*, oocyte enucleation; *d*, somatic cell capture with a micropipette; *e*, somatic cell transfer into the perivitelline space of the enucleated oocyte; *f*, completion of the nuclear transfer procedure: formation of the oocyte–somatic cell complex. Microscope: Eclipse Ti-U (Nikon, Japan). PB1 is indicated by white arrows, somatic cell by black arrows; $\times 200$.

В настоящем исследовании (см. табл. 1) цитохалазин Б на этапе подготовки созревших ооцитов к реконструированию не оказал значимого влияния на результативность NT и эффективность слияния, но повысил

выход клонированных эмбрионов ранних стадий развития как от числа полученных цитогридов ($p=0,0029$), так и от комплексов ооцит–СК ($p=0,041$). По всей видимости, действие цитохалазина Б на цитоархитектуру ооцитов

Таблица 1. Влияние цитохалазина B¹ на получение клонированных эмбрионов овец**Table 1.** Effect of cytochalasin B¹ on the production of cloned sheep embryos

Экспериментальная группа	Число ооцитов с ППТ, <i>n</i>	Получено					
		комплексов ооцит–СК		цитогрибидов ²		раздробившихся цитогрибидов ³	
		<i>n</i>	%, M±SEM	<i>n</i>	%, M±SEM	<i>n</i>	%, M±SEM
Контроль	201	193	96,3±1,6	62	33,9±5,1	21	35,7±7,7
Цитохалазин Б	319	312	97,8±1,7	114	35,6±3,7	65	59,7±6,9*

Примечание: ¹ — ооциты с первым полярным тельцем (ППТ) перед процедурой NT (энуклеации ооцитов и переноса в перивителлиновое пространство полученных цитопластов донорской соматической клетки, СК) кратковременно культивировали в среде TC-199 с 10% фетальной бычьей сыворотки в присутствии (7,5 мкг/мл в течение 20 мин) и отсутствии (контроль) цитохалазина Б; ² — доля цитогрибидов, рассчитанная как отношение количества цитогрибидов к числу комплексов ооцит–СК; ³ — доля раздробившихся цитогрибидов, рассчитанная как отношение количества раздробившихся цитогрибидов к числу цитогрибидов; * различия с контролем статистически значимы при $p=0,0029$.

Note: ¹ oocytes with the first polar body (PB1) were briefly cultured in TC-199 medium with 10% fetal bovine serum in the presence (7.5 µg/mL for 20 min) and absence (control) of cytochalasin B before the nuclear transfer procedure (enucleation of oocytes and transfer of donor somatic cell-derived cytoplasts into the perivitelline space); ² proportion of cytoplasmic hybrids, calculated as the ratio of the number of cytoplasmic hybrids to the number of oocyte-somatic cell complexes; ³ proportion of cleaved cytoplasmic hybrids, calculated as the ratio of the number of cleaved cytoplasmic hybrids to the number of cytoplasmic hybrids; * significant differences compared to the control, $p=0.0029$.

Таблица 2. Влияние цитохалазина B¹ на получение клонированных эмбрионов овец в зависимости от продолжительности процедуры NT (энуклеации ооцитов и переноса в перивителлиновое пространство полученных цитопластов донорской соматической клетки)**Table 2.** Effect of cytochalasin B¹ on the production of cloned sheep embryos depending on nuclear transfer duration

Продолжительность NT, мин	Число ооцитов с ППТ, <i>n</i>	Получено					
		комплексов ооцит–СК		цитогрибидов ²		раздробившихся цитогрибидов ³	
		<i>n</i>	%, M±SEM	<i>n</i>	%, M±SEM	<i>n</i>	%, M±SEM
≤40	205	194	94,3±2,5	84	44,0±3,2 ^a	45	55,2±6,8
>40	164	160	97,9±2,1	41	25,2±4,6 ^b	21	54,9±9,2

Примечание: ¹ — ооциты с первым полярным тельцем (ППТ) перед процедурой NT (энуклеацией ооцитов и переносом в перивителлиновое пространство полученных цитопластов донорской соматической клетки, СК) кратковременно культивировали в среде TC-199 с 10% ФБС в присутствии (7,5 мкг/мл в течение 20 мин) цитохалазина Б; ² — доля цитогрибидов, рассчитанная как отношение количества цитогрибидов к числу комплексов ооцит–СК; ³ — доля раздробившихся цитогрибидов, рассчитанная как отношение количества раздробившихся цитогрибидов к числу цитогрибидов; ^{a, b} — средние значения для одной группы, помеченные разными буквами, статистически значимо различаются при $p=0,002$.

Note: ¹ — oocytes with the first polar body (PB1) were briefly cultured in TC-199 medium with 10% FBS in the presence (7.5 µg/mL for 20 min) of cytochalasin B before the nuclear transfer procedure (enucleation of oocytes and transfer of donor somatic cell-derived cytoplasts into the perivitelline space); ² proportion of cytoplasmic hybrids, calculated as the ratio of the number of cytoplasmic hybrids to the number of oocyte-somatic cell complexes; ³ proportion of cleaved cytoplasmic hybrids, calculated as the ratio of the number of cleaved cytoplasmic hybrids to the number of cytoplasmic hybrids; ^{a, b} mean values within a single group marked with different letters are statistically significantly different at $p=0.002$.

проявляется спустя некоторое время, т.е. имеет долгосрочный эффект. Известно, что повреждение цитоскелета приводит к серьезным последствиям для жизнедеятельности клетки вплоть до остановки цитокинеза и митотического цикла [30]. Вероятно, стабилизация цитоскелета цитохалазином Б с последующей реполимеризацией микрофиламентов позволяет ооциту легче преодолевать деформации, вызванные микроманипуляциями, и способствует его более стабильной трансформации в клонированный эмбрион после слияния с СК.

Влияние обработки половых клеток цитохалазином Б на показатели эффективности клонирования, тем не менее, зависело от длительности NT: наблюдалось

снижение уровня слияния ($p=0,002$) и, как следствие, доли образования клонированных эмбрионов от числа комплексов ооцит–СК в случае превышения продолжительности процедуры NT более 40 мин ($p=0,042$) на фоне отсутствия негативного эффекта данного фактора на уровень дробления цитогрибидов. Нами сделано предположение, что изменение продолжительности микроманипуляций в сторону превышения допустимых временных значений (в наших условиях это не более 40 мин) имеет большее значение для электрических свойств ооцита и СК, чем для функциональных процессов, обеспечивающих переход полученного цитогрибидов к эмбриональному развитию.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Кратковременное культивирование созревших ооцитов в присутствии цитохалазина Б перед процедурой NT повышает выход клонированных эмбрионов овец ранних стадий развития. Удлинение продолжительности периода энуклеации ооцитов, прединкубированных в цитохалазине Б, и переноса в них ядра СК до более 40 мин приводит к снижению показателей результативности SCNT овец. В целом, учитывая выраженный долгосрочный эффект цитохалазина Б на ооциты, полученные нами результаты и выявленные закономерности 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.

ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

Вклад авторов. А.В. Лопухов — обзор и анализ литературных источников, участие в проведение экспериментов, обработка и анализ полученных результатов, подготовка статьи к публикации; Е.Н. Шедова — участие в проведении экспериментов; Е.В. Цындрина — участие в проведении экспериментов; Г.Н. Сингина — общее руководство, участие в проведение экспериментов, подготовка статьи к публикации. Все авторы одобрили рукопись (версию для публикации), а также согласились нести ответственность за все аспекты работы, гарантируя надлежащее рассмотрение и решение вопросов, связанных с точностью и добросовестностью любой её части.

Этическая экспертиза. Неприменимо.

Источник финансирования. Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования РФ (Государственное задание № FGGN-2024-0014).

Раскрытие интересов. Авторы заявляют об отсутствии отношений, деятельности и интересов за последние три года, связанных с третьими лицами (коммерческими и некоммерческими), интересы которых могут быть затронуты содержанием статьи.

Оригинальность. При создании настоящей работы авторы не использовали ранее опубликованные сведения (текст, иллюстрации, данные).

Доступ к данным. Все данные, полученные в настоящем исследовании, доступны в статье.

Генеративный искусственный интеллект. При создании настоящей статьи технологии генеративного искусственного интеллекта не использовали.

Рассмотрение и рецензирование. Настоящая работа подана в журнал в инициативном порядке и рассмотрена по обычной процедуре. В рецензировании участвовали три члена редакционной коллегии и научный редактор издания.

ADDITIONAL INFORMATION

Authors' contributions. A.V. Lopukhov — review and analysis of literature sources, participation in experiments, processing and analysis of the obtained results, preparation of the article for publication; E.N. Shedova — participation in experiments; E.V. Tsyndrina — participation in experiments; G.N. Singina — general management, participation in experiments, preparation of the article for publication. All authors approved the manuscript (version for publication) and agreed to take responsibility for all aspects of the work, ensuring the proper consideration and resolution of any issues related to the accuracy and integrity of any part of the study.

Ethics approval. Not applicable.

Funding sources. This work was financially supported by the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation (State assignment No. FGGN-2024-0014).

Disclosure of interests. The authors declare no relationships, activities, or interests over the past three years involving third parties (commercial or non-commercial) whose interests could be affected by the content of this article.

Statement of originality. The authors did not use any previously published material (text, illustrations, or data) in the preparation of this work.

Data availability statement. All data obtained in the present study are available in the article.

Generative AI. No generative artificial intelligence technologies were used in the preparation of this article.

Provenance and peer-review. This work was submitted to the journal on the authors' initiative and underwent the standard review process. The manuscript was reviewed by three members of the editorial board and the journal's scientific editor.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ | REFERENCES

1. Mrowiec P, Bugno-Poniewierska M, Młodawska W. The perspective of the incompatible of nucleus and mitochondria in interspecies somatic cell nuclear transfer for endangered species. *Reprod Domest Anim.* 2021;56(2):199–207. doi: 10.1111/rda.13864 EDN: MRZYTM
2. Bishop TF, Van Eenennaam AL. Genome editing approaches to augment livestock breeding programs. *J Exp Biol.* 2020;223(Pt Suppl. 1):jeb207159. doi: 10.1242/jeb.207159 EDN: XONLIX
3. Hay AN, Farrell K, Leeth CM, Lee K. Use of genome editing techniques to produce transgenic farm animals. *Adv Exp Med*

Biol. 2022;1354:279–297. doi: 10.1007/978-3-030-85686-1_14 EDN: LWVXTR

4. Eriksson S, Jonas E, Rydhmer L, Röcklinsberg H. Invited review: Breeding and ethical perspectives on genetically modified and genome edited cattle. *J Dairy Sci.* 2018;101(1):1–17. doi: 10.3168/jds.2017-12962

5. Lunney JK, Van Goor A, Walker KE, et al. Importance of the pig as a human biomedical model. *Sci Transl Med.* 2021;13(621):eabd5758. doi: 10.1126/scitranslmed.abd5758 EDN: IGFKHQ

6. Wolf E, Kind A, Aigner B, et al. Genetically engineered large animals in biomedicine. In: *Animal Biotechnology 2*. Springer Cham; 2018. P. 169–214. doi: 10.1007/978-3-319-92348-2_9
7. Wenzel N, Blaczyk R, Figueiredo K. Animal models in allogenic solid organ transplantation. *Transplantation*. 2021;2(4):412–424. doi: 10.3390/transplantation2040039
8. Kalds P, Zhou S, Cai B, et al. Sheep and goat genome engineering: from random transgenesis to the CRISPR era. *Front Genet*. 2019;10:750. doi: 10.3389/fgene.2019.00750 EDN: WJIMGH
9. Shepelev MV, Kalinichenko SV, Deykin AV, Korobko IV. Production of recombinant proteins in the milk of transgenic animals: current state and prospects. *Acta Naturae*. 2018;10(3):40–47. doi: 10.32607/20758251-2018-10-3-40-47 EDN: YLQJFB
10. McGregor CGA, Byrne GW, Fan Z, Davies CJ, Polejaeva IA. Genetically engineered sheep: A new paradigm for future pre-clinical testing of biological heart valves. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2023;166(4):e142–e152. doi: 10.1016/j.jtcvs.2023.02.007 EDN: ZOPTMM
11. Vazquez-Avenidaño JR, Ambríz-García DA, Cortez-Romero C, et al. Current state of the efficiency of sheep embryo production through somatic cell nuclear transfer. *Small Rum Res*. 2022;212(1):106702. doi: 10.1016/j.smallrumres.2022.106702
12. Srirattana K, Kaneda M, Parnpai R. Strategies to improve the efficiency of somatic cell nuclear transfer. *Int J Mol Sci*. 2022;23(4):1969. doi: 10.3390/ijms23041969 EDN: NIFHCI
13. Keefer CL. Artificial cloning of domestic animals. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015;112(29):8874–8878. doi: 10.1073/pnas.1501718112
14. Whitworth KM, Prather RS. Somatic cell nuclear transfer efficiency: how can it be improved through nuclear remodeling and reprogramming? *Mol Reprod Dev*. 2010;77(12):1001–1015. doi: 10.1002/mrd.21242 EDN: NYXGQH
15. Karja NW, Otoi T, Wongsrikeao P, et al. Effects of electric field strengths on fusion and in vitro development of domestic cat embryos derived by somatic cell nuclear transfer. *Theriogenology*. 2006;66(5):1237–1242. doi: 10.1016/j.theriogenology.2006.03.034
16. Miyoshi K, Rzucidlo SJ, Pratt SL, Stice SL. Improvements in cloning efficiencies may be possible by increasing uniformity in recipient oocytes and donor cells. *Biol Reprod*. 2003;68:1079–1086. doi: 10.1095/biolreprod.102.010876
17. Cordova K, Rzucidlo SJ, Pratt SL, Stice SL. Improvements in cloning efficiencies may be possible by increasing uniformity in recipient oocytes and donor cells. *Biol Reprod*. 2003;68(4):1079–1086. doi: 10.1095/biolreprod.102.010876 Erratum in: *Biol Reprod*. 2004;70(1):260.
18. Wilmut I, Bai Y, Taylor J. Somatic cell nuclear transfer: origins, the present position and future opportunities. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2015;370(1680):20140366. doi: 10.1098/rstb.2014.0366
19. Akagi S, Shiraishi T, Somfai T, et al. Effects of the timing of cumulus cell removal from bovine oocytes on enucleation rate and subsequent development after somatic cell nuclear transfer. *J Reprod Dev*. 2012;58(5):615–619. doi: 10.1262/jrd.2012-042 EDN: RKHQIB
20. Campbell KH, Fisher P, Chen WC, et al. Somatic cell nuclear transfer: Past, present and future perspectives. *Theriogenology*. 2007;68 Suppl. 1:S214–S231. doi: 10.1016/j.theriogenology.2007.05.059
21. Hwang IS, Bae HK, Park CK, et al. Generation of reactive oxygen species in bovine somatic cell nuclear transfer embryos during micromanipulation procedures. *Journal of Animal Reproduction and Biotechnology*. 2012;36(1):49–53. doi: 10.1071/RDv23n1Ab28
22. Chen SU, Chao KH, Chang CY, et al. Technical aspects of the piezo, la-ser-assisted, and conventional methods for nuclear transfer of mouse oocytes and their efficiency and efficacy: Piezo minimizes damage of the ooplasmic membrane at injection. *J Exp Zool A Comp Exp Biol*. 2004;301(4):344–351. doi: 10.1002/jez.a.20037
23. Lee E, Estrada J, Piedrahita JA. A 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
24. Hwang IS, Bae HK, Cheong HT. Mitochondrial and DNA damage in bovine somatic cell nuclear transfer embryos. *J Vet Sci*. 2013;14(3):235–240. doi: 10.4142/jvs.2013.14.3.235
25. Simerly C, Dominko T, Navara C, et al. Molecular correlates of primate nuclear transfer failures. *Science*. 2003;300(5617):297. doi: 10.1126/science.1082091 EDN: GPEOGT
26. Greising T, Jonas L. The influence of enucleation on the ultrastructure of in vitro matured and enucleated cattle oocytes. *Theriogenology*. 1999;52(2):303–312. doi: 10.1016/S0093-691X(99)00130-2
27. Li GP, White KL, Bunch TD. Review of enucleation methods and procedures used in animal cloning: state of the art. *Cloning Stem Cells*. 2004;6(1):5–13. doi: 10.1089/15362300460743781
28. Sun MZ, Liu YW, Cui MS, et al. Intracellular strain evaluation-based oocyte enucleation and its application in robotic cloning. *Engineering*. 2022;24:73–83. doi: 10.1016/j.eng.2022.04.016
29. Rajan S, Kudryashov DS, Reisler E. Actin bundles dynamics and architecture. *Biomolecules*. 2023;13(3):450. doi: 10.3390/biom13030450 EDN: VOTXXV
30. Sun QY, Schatten H. Regulation of dynamic events by microfilaments during oocyte maturation and fertilization. *Reproduction*. 2006;131(2):193–205. doi: 10.1530/rep.1.00847
31. Ferreira EM, Vireque AA, Adona PR, et al. Cytoplasmic maturation of bovine oocytes: structural and biochemical modifications and acquisition of developmental competence. *Theriogenology*. 2009;71(5):836–848. doi: 10.1016/j.theriogenology.2008.10.023 EDN: MNDSSZ Erratum in: *Theriogenology*. 2010;73(8):1164.
32. Meng Q, Wu X, Bunch TD, et al. Enucleation of demecolcine-treated bovine oocytes in cytochalasin-free medium: mechanism investigation and practical improvement. *Cell Reprogram*. 2011;13(5):411–418. doi: 10.1089/cell.2011.0012
33. Phillips MJ, Oda M, Yousef IM, Funatsu K. Effects of cytochalasin B on membrane-associated micro-filaments in a cell-free system. *J Cell Biol*. 1981;91(2 Pt 1):524–530. doi: 10.1083/jcb.91.2.524
34. Prather RS, First NL. Nuclear transfer in mammalian embryos. *Int Rev Cytol*. 1990;120:169–190. doi: 10.1016/s0074-7696(08)61600-9
35. Edwards JL, Schrick FN, McCracken MD, et al. Cloning adult farm animals: a review of the possibilities and problems associated with somatic cell nuclear transfer. *Am J Reprod Immunol*. 2003;50(2):113–123. doi: 10.1034/j.1600-0897.2003.00064.x EDN: ETNNTJ
36. Yin Y, Hao H, Xu X, et al. Generation of an MC3R knock-out pig by CRISPR/Cas9 combined with somatic cell nuclear transfer (SCNT) technology. *Lipids Health Dis*. 2019;18(1):122. doi: 10.1186/s12944-019-1073-9 EDN: PPVIMV
37. Yuan Y, Liu R, Zhang X, et al. Effects of recipient oocyte source, number of transferred embryos and season on somatic cell nuclear transfer efficiency in sheep. *Reprod Domest Anim*. 2019;54(11):1443–1448. doi: 10.1111/rda.13546

38. Wu X, Ouyang H, Duan B, et al. Production of cloned transgenic cow expressing omega-3 fatty acids. *Transgenic Res.* 2012;21(3):537–543. doi: 10.1007/s11248-011-9554-2 EDN: THCUQE
39. Choi YH, Norris JD, Velez IC, et al. A viable foal obtained by equine somatic cell nuclear transfer using oocytes recovered from immature follicles of live mares. *Theriogenology.* 2013;79(5):791–6.e1. doi: 10.1016/j.theriogenology.2012.12.005
40. Felmer R, Arias ME. Developmental rates of bovine nuclear transfer embryos derived from different fetal non-transfected and transfected cells. *Electron J Biotechnology.* 2011;14(3):5. doi: 10.2225/vol14-issue3-fulltext-8
41. Bi Y, Hua Z, Liu X, et al. Isozygous and selectable marker-free MSTN knockout cloned pigs generated by the combined use of CRISPR/Cas9 and Cre/LoxP. *Sci Rep.* 2016;6:31729. doi: 10.1038/srep31729
42. Iuso D, Czernik M, Zacchini F, et al. A simplified approach for oocyte enucleation in mammalian cloning. *Cell Rerogram.* 2013;15(6):490–494. doi: 10.1089/cell.2013.0051
43. Singina GN. In vitro development of cloned embryo in cattle in relation with fusion and activation parameters. *Agricultural Biology.* 2020;55(2):295–305. doi: 10.15389/agrobiology.2020.2.295eng EDN: JCDCTN
44. Singina GN, Lukanina VA, Shedova EN, et al. The results of production and transplantation of IVEP embryos in sheep (*Ovis aries*). *Agricultural Biology.* 2023;58(6):1088–1099. doi: 10.15389/agrobiology.2023.6.1088eng EDN: ESYMBU
45. Singina GN, Lopukhov AV, Shedova EN, et al. The Influence of oocyte and donor cell preparation conditions on the efficiency of somatic cloning in sheep (*Ovis aries* L.). *Agricultural Biology.* 2024;59(4):692–703. doi: 10.15389/agrobiology.2024.4.692eng EDN: COBRNN
46. Czernik M, Anzalone DA, Palazzese L, et al. Somatic cell nuclear transfer: failures, successes and the challenges ahead. *Int J Dev Biol.* 2019;63(3–4–5):123–130. doi: 10.1387/ijdb.180324mc
47. Zhao Q, Qiu J, Feng Z, et al. Robotic label-free precise oocyte enucleation for improving developmental competence of cloned embryos. *IEEE Trans Biomed Eng.* 2021;68(8):2348–2359. doi: 10.1109/TBME.2020.3036494 EDN: CPTPAZ
48. McGrath J, Solter D. Nuclear transplantation in the mouse embryo by microsurgery and cell fusion. *Science.* 1983;220(4603):1300–1302. doi: 10.1126/science.6857250 EDN: IDSCIF
49. Heindryckx B, Van der Elst J, Dhont M. Culture medium preferences of pre-implantation cloned mouse embryos. *Methods Mol Biol.* 2006;348:59–78. doi: 10.1007/978-1-59745-154-3_4

ОБ АВТОРАХ

* Лопухов Александр Викторович;

адрес: Россия, 142132, Московская область, городской округ Подольск, поселок Дубровицы, д. 60;
ORCID: 0000-0002-1284-1486;
eLibrary SPIN: 1092-2523;
e-mail: vubi_myaso@mail.ru

Шедова Екатерина Николаевна;

ORCID: 0000-0002-9642-2384;
eLibrary SPIN: 1067-8115;
e-mail: shedvek@yandex.ru

Цындрина Евгения Валериевна;

ORCID: 0000-0002-3263-2358;
e-mail: kiril04kina@yandex.ru

Сингина Галина Николаевна, канд. биол. наук;

ORCID: 0000-0003-0198-9757;
eLibrary SPIN: 4118-2990;
e-mail: g_singina@mail.ru

* Автор, ответственный за переписку / Corresponding author

AUTHORS' INFO

* Alexandr V. Lopukhov;

address: 60 village Dubrovitsy, Podolsk, Moscow Region, Russia, 142132;
ORCID: 0000-0002-1284-1486;
eLibrary SPIN: 1092-2523;
e-mail: vubi_myaso@mail.ru

Ekaterina N. Shedova;

ORCID: 0000-0002-9642-2384;
eLibrary SPIN: 1067-8115;
e-mail: shedvek@yandex.ru

Evgeniya V. Tsyndrina;

ORCID: 0000-0002-3263-2358;
e-mail: kiril04kina@yandex.ru

Galina N. Singina, Cand. Sci. (Biology);

ORCID: 0000-0003-0198-9757;
eLibrary SPIN: 4118-2990;
e-mail: g_singina@mail.ru