
ВОСПРОИЗВОДСТВО

УДК 636.2.055:591.3

DOI:10.25687/1996-6733.prodanimbiol.2024.2.31-44

**АПРОБАЦИЯ ПРОГРЕССИВНОЙ ТЕХНОЛОГИИ КЛОНИРОВАНИЯ
КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА**

²Кириенко К.В., ^{2,5}Миронова А.Г., ¹Икономов П.Г., ^{2,3}Апрышко В.П.,
¹Бондаренко М.С., ¹Гришин Д.С., ¹Заводовская М.С., ¹Мартын В.Ф., ¹Васильева О.В.,
¹Семенова Е.И., ¹Шокирова Н.С., ⁶Крашенинников М.Е., ^{2,4}Яковенко С.А.

¹Усть-Лабинск Краснодарского края, биотехнологическая лаборатория» (ООО «Альтра-ген»). ²Клиника репродукции человека «АльтраВита» (ООО «ЭКО ЦЕНТР»), Москва; ^{3,4}МГУ; ⁵Институт биохимической физики РАН, Москва; ⁶Научно-образовательный ресурсный центр «Клеточные технологии». Российский университет дружбы народов, Москва. Российская Федерация.

Перенос ядер соматических клеток (Somatic Cell Nuclear Transfer, SCNT) до настоящего времени был наиболее эффективным и жизнеспособным методом размножения ценных или находящихся под угрозой исчезновения животных. Более 99% эмбрионов или живого потомства, о которых ранее сообщалось, были получены с помощью подхода, основанного на микроманипуляциях, т.е. с использованием традиционного SCNT. При «ручном» клонировании (Hand-made Cloning, НМС) процедуры энуклеации ооцитов и реконструирования эмбрионов осуществляются в отсутствие *zona pellucida*, и все манипуляции проводятся без использования микроманипуляторов. К настоящему времени, в мире были получены положительные результаты по получению клонированного потомства от крупного рогатого скота, буйволов, овец, свиней и лошадей с использованием НМС. Цель исследования – апробация технологии клонирования крупного рогатого скота по методу НМС. Яичники коров голштинской породы были получены с местной бойни в течение 20–30 мин после убоя и доставляны в лабораторию в течение 3 ч. Изучена эффективность основных этапов технологии клонирования методом НМС: дозревание ооцитов крупного рогатого скота *in vitro*, с последующим их использованием в качестве доноров цитопластов; получение культуры соматических клеток от высокопродуктивной коровы голштинской породы, использование её в качестве клеток доноров кариопластов; активация, культивирование и трансплантация реконструированных эмбрионов корове-реципиенту, генетическое тестирование полученного потомства. В результате исследования впервые в Российской Федерации получена клонированная тёлочка голштинской породы с использованием метода НМС. Полученные результаты свидетельствуют о возможности практического использования технологии НМС для получения потомства высокопродуктивных коров.

Ключевые слова: КРС, «ручное» клонирование, энуклеация ооцитов, реконструирование эмбрионов, получение бластоцист, генетическое тестирование.

Проблемы биологии продуктивных животных. 2024. 2: 31-44.

Введение

Перенос ядер соматических клеток (Somatic Cell Nuclear Transfer, SCNT) является наиболее эффективным и жизнеспособным методом размножения ценных или находящихся под угрозой исчезновения животных (Lanza et al., 2000). После рождения первого клонированного животного - овцы «Долли», с использованием микроманипуляционной техники энуклеации и реконструирования эмбрионов, было получено большое число высокоценных животных разных видов. Более 99% эмбрионов или живого потомства, о которых сообщалось, были получены с помощью подхода, основанного на микроманипуляциях, т.е. с использованием традиционного SCNT (Vajta et al., 2005). Однако сложная процедура микроманипуляций и дороговизна необходимого оборудования препятствуют широкому внедрению SCNT с целью воспроизводства высокопродуктивных животных. Таким образом, для широкого использования клонирования необходимо снизить затраты, без ущерба для эффективности самой технологии (Vajta et al., 2003). «Ручное» клонирование (Hand-made Cloning, HMC) - это усовершенствованный вариант SCNT, при котором процедуры энуклеации ооцитов и реконструирования эмбрионов осуществляются в отсутствие *zona pellucida*, а все манипуляции проводятся «вручную», без использования микроманипуляторов (Кириенко, Апрышко, Яковенко, 2003; Vajta et al., 2001). При использовании метода HMC отпала необходимость в дорогостоящем оборудовании, снизилась трудоемкость технологии и значительно ускорился процесс энуклеации яйцеклеток, что явилось революцией в области эмбриологии (Verma et al., 2015). Разработка методики энуклеации ооцитов без *zona pellucida* (Li et al., 2014; Tani et al., 2006; Tatham et al., 1995) и системы культивирования в микролунках (Akshey et al., 2010; Vajta et al., 2004; Vajta et al., 2000) сделала HMC более эффективным и экономичным методом по сравнению с традиционным SCNT. К настоящему времени, с использованием HMC было получено клонированное потомство от крупного рогатого скота (Oback et al., 2003), буйволов (George et al., 2011), овец (Zhang et al., 2013), свиней (Du et al., 2007) и лошадей (Lagutina et al., 2005), поэтому технология HMC считается более предпочтительной, нежели SCNT на основе микроманипуляций (Vajta, 2007). Предыдущие исследования показали, что потенциал развития HMC эмбрионов *in vitro* равен или даже превосходит данный показатель, полученный с использованием традиционного SCNT.

Целью настоящей работы было проведение всех этапов технологии HMC для оценки возможности практического её применения для получения клонированного потомства высокопродуктивных коров.

Материал и методы

Реагенты и среды. Все используемые реагенты были приобретены у Sigma Chemical Co. (Сент-Луис, Миссури, США), за исключением сыворотки крови коровы (cow serum, CS), которую получали и готовили самостоятельно. Среда ДМЕМ (DMEM, кат. №C420п), фосфатно-солевой раствор Дюльбекко (DPBS, кат. № P061, P060), раствор трипсина-ЭДТА (кат. №П041), пенициллин/стрептомицин (кат. №A065), гентамицин (кат. №A011) были приобретены в ООО НПП «ПанЭко» (Москва, Россия). Вода для растворов (кат. №1.2.5.1.) была куплена в ООО «БиолоТ» (Санкт-Петербург, Россия). Приготовление сред и растворов, использованных в этом исследовании, включая: T0, T2, T10, T20 (Среда TCM-199 забуференная NEPES, с добавлением 0, 2, 10 или 20% CS, соответственно); среды для аспирации ооцитов (TCM-aspiration), дозревания ооцитов (IVM-media) и культивирования эмбрионов (IVC-media); среды для электрослияния

Fusion medium (неэлектролитный раствор маннитола), растворы гиалуронидазы, проназы, фитогемагглютинина (ФГА), Са-ионофора A23187 и 6-DMAP, было выполнено согласно Vajta (Vajta, Lewis, Tecirlioglu, 2006).

Дозревание ооцитов in vitro. Дозревание ооцитов *in vitro* было выполнено, как описано ранее Vajta (Vajta, Lewis, Tecirlioglu, 2006). Яичники коров были получены с местной бойни. Яичники вырезали в течение 20–30 мин после убоя и доставляли в лабораторию в течение 3 ч в термосе, содержащем DPBS, при температуре 35–37°C. Ооцит-кумуляные комплексы (ОКК) извлекали путем аспирации фолликулов диаметром 2–6 мм с помощью вакуумной аспирационной системы, оснащенной иглой калибром 18G. ОКК с многослойным кумулюсом отбирали для дозревания *in vitro* (IVM). Затем ОКК дважды отмывали в среде IVM (среда TCM-199 с добавлением 26,2 мМ NaHCO₃, 5 мМ NEPEP, 15% CS и 15 МЕ/мл чХГ). Дозревание осуществляли в течение 22-24 часов в четырехлуночной планшете Nunc, содержащем 400 мкл/лунка среды IVM под слоем минерального масла, в увлажненной атмосфере с 5% CO₂ при 38,5°C.

Получение клеток доноров кариопластов. Первичная культура фибробластов была получена из биоптата кожи вымени, взятого в асептических условиях с использованием местной анестезии у взрослой чистопородной голштинской коровы класса элита-рекорд инв.№ 1310052 (живая масса - 630 кг; количество лактаций – 7; средний удой за лактацию – 16633 л; максимальный удой за лактацию – 24816 л; средний % жира за лактацию – 3,67; максимальный % жира за лактацию – 3,84; средний % белка за лактацию – 3,16; максимальный % белка за лактацию – 3,21).

После взятия биоптата ткань нарежали на кусочки размером 1-3 мм и помещали в раствор трипсина-ЭДТА для диссоциации. Полученную клеточную суспензию отмывали в DPBS, содержащем 20% CS, после чего клетки седиментировали и рассеивали во флаконы для клеточных культур в среду DMEM с 10% эмбриональной телячьей сыворотки. Культивирование пассажируемой клеточной культуры осуществляли в CO₂-инкубаторе в увлажненной атмосфере с 5% CO₂ при 38,5°C. Культура кожных фибробластов была размножена тремя пассажами, а затем криоконсервирована. В качестве кариопластов использовали фибробласты размером 12-15 мкм на стадии G0-G1, полученные из клеточного монослоя со 100% конфлюэнтностью.

Реконструирование эмбрионов методом НМС. Процедура клонирования методом НМС была выполнена согласно Vajta (Vajta, Lewis, Tecirlioglu, 2006) с некоторыми модификациями. Ооциты денудировались в среде T2, содержащей 0,5 мг/мл гиалуронидазы. Для работы отбирали ооциты на стадии МП с выделившимся первым полярным тельцем. После денудации ооциты на 1 ч помещались в среду T2, содержащую 10 мкг/мл демекольцина, после чего у ооцитов ферментативно удаляли *zona pellucida* в среде T10, содержащей 2 мг/мл проназы. Ооциты без *zona pellucida* с хорошо заметным экструдирующимся веретеном деления переносили в среду T20 для инактивации проназы. Энуклеацию осуществляли в среде T2 с помощью микролезвия путем бисекции ооцита, отсекая часть ооцита, содержащую экструдирующееся веретено деления. Процедура бисекции осуществлялась под визуальным контролем с использованием бинокулярной лупы. Части ооцитов без веретена деления (~60-75% от объема исходного ооцита) отбирали и использовали, впоследствии, в качестве цитопластов. Полученные в результате бисекции цитопласты переносили в среду T20 до восстановления сферической формы. После этого цитопласт погружали в среду T0, содержащую 5 мг/мл фитогемагглютинина, на 3-5 сек и переносили в каплю среды T2, содержащую донорские клетки. Цитопласт соединяли с одним

округлым фибробластом (кариопластом), после чего полученный комплекс кариопласт/цитопласт переносили в каплю среды для слияния (0,3 М маннитол, 0,05 мМ CaCl₂, 0,1 мМ MgSO₄, 1 мг/мл PVA). Комплекс кариопласт/цитопласт помещали в камеру для электрослияния с той же средой и ориентировали комплекс перпендикулярно электродам. После этого комплекс объединяли с ещё одним цитопластом, с получением результирующего триплета цитопласт/кариопласт/цитопласт.

Слияние осуществляли с помощью электропоратора собственного производства, посредством однократного импульса постоянного тока 1,9 кВ/см с длительностью 8 мкс. Для выравнивания триплетов на электродах, перед подачей импульса постоянного тока, использовали переменный электрический ток частотой 400 кГц и напряжением 0,2 кВ/см, с подъемом напряжения непосредственно перед импульсом до 0,4 кВ/см.

После электрослияния триплеты инкубировали при 38,5°C в среде T20 до полного слияния клеточных мембран с образованием реконструированного эмбриона. Полученные реконструированные эмбрионы в течение 2 ч культивировали в среде IVC, до момента активации. Активацию индуцировали воздействием 10 мкМ Са-ионофора A23187 в среде T2 в течение 5 мин с последующей инкубацией в среде IVC, содержащей 2 мМ 6-диметиламинопурина (6-DMAP) в течение 5 ч в увлажненной атмосфере с 5% CO₂ при 38,5°C (Vajta, Lewis, Tecirlioglu, 2006).

Культивирование эмбрионов in vitro. Культивирование реконструированных эмбрионов *in vitro* проводили, как описано ранее (Vajta et al., 2000). Для культивирования реконструированных эмбрионов использовалась модифицированная система культивирования WOW (well-of-the-well, «лунка в лунке»), согласно которой эмбрионы культивировали в микролунках, самостоятельно сделанных в лунках 4-х луночного планшета Nunc. Эмбрионы индивидуально рассаживали по микролункам (до 20 шт), лунки предварительно заполняли 400 мкл среды IVC с добавлением 5% CS и покрывали 400 мкл минерального масла. Культивирование осуществляли в CO₂-инкубаторе в увлажненной атмосфере с 5% CO₂, 5% O₂ и 90% N₂ при 38,5°C. Дробление реконструированных эмбрионов оценивали на 2-й день (0-й день – день реконструирования), а развитие до стадии бластоцисты регистрировали до восьмого дня культивирования. Полученные бластоцисты хорошего качества были криоконсервированы методом витрификации и хранились в жидком азоте при -196°C до момента оттаивания и переноса в рога маток коров-реципиентов.

Синхронизация эстрального цикла реципиентов и перенос эмбрионов. Животными-реципиентами служили 14-16 мес. тёлки голштинской породы, выращенные в условиях молочно-товарной фермы АО «Рассвет» Краснодарского края. Перед использованием животных в качестве реципиентов тёлки проверялись на наличие регулярного эстрального цикла.

Синхронизацию эстрального цикла реципиентов и перенос эмбрионов проводили как описано ранее (Yang et al., 2012). Телкам с интактной маткой вводили 100 мкг аналога ГнРГ в 0-й день, 500 мкг аналога PGF2 α на 7-й день и 100 мкг аналога ГнРГ на 9-й день индуцированного эстрального цикла. Эструс наблюдали с 10-го по 13-й день. На 7-й день индуцированного эстрального цикла криоконсервированные/оттаянные бластоцисты были перенесены нехирургическим путем в рог матки, ипсилатеральный по отношению к яичнику, содержащему пальпируемое желтое тело.

Эмбрионы индивидуально помещали в соломинки объёмом 0,25 мл и транспортировали в портативном переносном инкубаторе при температуре 38,5°C из лаборатории до фермы.

Перенос эмбрионов осуществлялся с использованием катетера для переноса эмбрионов под эпидуральной анестезией.

Статус стельности определяли УЗИ-сканером через 30 дней и повторно ректальной пальпацией через 60 дней после переноса эмбрионов.

Организация отёлов и генетическое тестирование. Стельные реципиенты до отёла находились на групповом беспривязном содержании. За 21 день до предполагаемого отела животных переводили в индивидуальные клетки. Клонированные телята были рождены либо в результате естественного отела, либо путем кесарева сечения после введения корове-реципиенту, за 36 часов до планируемой операции, 20 мг дексаметазона внутримышечно. В случае необходимости, новорождённым телятам проводились реанимационные мероприятия: удаление слизи из дыхательных путей, оксигенотерапия (6 л/мин), ингаляция сальбутамолом с постоянным контролем сатурации и ЧСС. В течение первых 2 ч после отела телята получали молозиво, регистрировались масса тела, пол и продолжительность стельности. Телят изолировали и наблюдали до 1-месячного возраста.

Для генетического тестирования были использованы пробы крови от клонированного теленка и от коровы-реципиента (суррогатной матери), а также культура фибробластов кожи коровы-донора кариопластов. Сравнение ДНК-профилей животных проводилось путем анализа STR-локусов методом капиллярного электрофореза с использованием генетического анализатора и программного обеспечения Genemapper (Applied Biosystems, США).

Результаты и обсуждение

За период с 11.10.2022 по 22.06.2023 было проделано 35 экспериментов по клонированию крупного рогатого скота методом НМС. За время работы из фолликулов яичников коров было получено 17606 ОКК, выделенных из 1174 коровьих яичников, 11268 ОКК было поставлено на созревание *in vitro*. Эффективность созревания ооцитов до стадии МП составила 69,9% (7879 из 11268). Бисекции подверглись 7786 ооцитов МП, из которых было получено 6423 цитопласта. Эффективность бисекции составила 82,5% (6423 из 7786). Для реконструирования эмбрионов было использовано 5764 цитопласта с получением 2324 триплетов цитопласт/кариопласт/цитопласт. После электрослияния было получено 1718 реконструированных эмбриона. Эффективность электрослияния составила 73,9% (1718 из 2324). Через 2 ч после электрослияния был активирован 1591 реконструированный эмбрион. При оценке 2-го дня развития в деление дроблением вступил 71% реконструированных эмбрионов от числа активированных (1130 из 1591). До стадии бластоцисты развилось 13,1% эмбрионов (148 из 1130), а доля бластоцист хорошего качества составила 10,3% (116 из 1130). Реконструированные бластоцисты хорошего качества были перенесены в рог матки синхронизированных телок-реципиентов (11 эмбрионов) или криоконсервированы (105 эмбрионов). После подготовки телок реципиентов 23 эмбриона были разморожены и перенесены в рог матки суррогатным матерям. Количество перенесенных эмбрионов в расчете на 1 телку-реципиента составило 1 эмбрион.

На 60-й день после переноса эмбрионов, стельность была выявлена у 8 животных. На 12-й неделе произошло прерывание стельности у двух суррогатных матерей, а позднее, на 22-й неделе, abortировало еще одно животное. На 41,5-й неделе стельности в результате естественного отела было зафиксировано мертворождение. Вес теленка составил 59 кг.

Полученные результаты представлены в табл. 1.

Таблица 1. Эффективность получения клонированного потомства крупного рогатого скота методом НМС

Основные этапы НМС	Эффективность	
	n (шт)	%
Получено ОКК при аспирации фолликулов	17606	
Поставлено ОКК на дозревание <i>in vitro</i>	11268	
Получено ооцитов на стадии МШ после дозревания	7879	69,9
Подвергнуто ооцитов процедуре бисекции	7786	
Получено цитопластов, после бисекции	6423	82,5
Использовано цитопластов, с целью реконструирования эмбрионов	5764	
Получено триплетов цитопласт/кариопласт/цитопласт	2324	
Реконструировано эмбрионов (слито триплетов)	1718	73,9
Активировано реконструированных эмбрионов	1591	
Продрибилось эмбрионов на 2-й день развития	1130	71,0
Развилось эмбрионов до стадии бластоцисты:	148	13,1
- в том числе до бластоцист хорошего качества	116	10,3
Криоконсервировано эмбрионов	105	
Оттаяно эмбрионов	23	
Перенесено оттаянных эмбрионов в матку телок-реципиентов:	20	
- в том числе эмбрионов 7-го дня развития	15	
- в том числе эмбрионов 8-го дня развития	5	
Перенесено свежих эмбрионов в матку телок-реципиентов	11	
- в том числе эмбрионов 7-го дня развития	9	
- в том числе эмбрионов 8-го дня развития	2	
Количество перенесенных эмбрионов в расчете на 1 телку-реципиента	1	
Стельных реципиентов на 60-й день после переноса эмбрионов	8	25,8
Реципиентов на позднем сроке стельности	1	12,5
Абортировано плодов:	3	37,5
- в том числе в I триместре стельности	2	25,0
- в том числе во II триместре стельности	1	12,5
Отелов:	4	100
- в том числе мертворождений	1	25
- в том числе живорождений, с гибелью телят в первые часы жизни	2	50
- в том числе живорождений, с жизнеспособным теленком (живым >10 сут.)	1	25

В связи крупноплодностью полученного теленка было принято решение последующие отелы проводить с использованием кесарева сечения. Следующие два отёла проходили с использованием кесарева сечения; на сроке 37 недель были получены 2 живые телочки весом по 58 кг каждая. В течение первых 2-х часов после отёла у полученных телят констатировали смерть в связи с дыхательной недостаточностью. Данные по клиническим исходам отёлов клонированными телятами представлены в табл. 2.

В результате кесарева сечения на 40,5-й неделе стельности, впервые в России, методом Hand-made Cloning была получена жизнеспособная клонированная телочка весом 70 кг (рис. 1).

Таблица 2. Клинические исходы отёлов клонированными телятами

№ отела	Срок отёла, недели	Вид отёла/ родовспоможения	Вес телят при рождении, кг	Исход отёла
1	41,5	Естественный отёл	59	Мертворождение
2	37	Кесарево сечение	58	Гибель теленка в первые 2 часа жизни
3	37	Кесарево сечение	58	Гибель теленка в первые 2 часа жизни
4	40,5	Кесарево сечение	70	Живорождение жизнеспособным телёнком (живым >10 суток)



Рис. 1. Корова-донор кариопластов (А) и тёлочка, полученная методом клонирования (возраст 2 недели) (Б).

В результате проведенного генетического тестирования в двух независимых лабораториях (DNK-center, г. Москва; KSITEST, г. Москва) было выявлено полное совпадение ДНК-профилей по исследованным STR-локусам в образцах клонированного телёнка и коровы-донора кариопластов №1310052, и их несовпадение с ДНК-профилем коровы-реципиента №2210438 (суррогатная мать). Данные представлены в табл. 3.

До сих пор менее одного процента попыток клонирования приводят к успешным родам (Saini et al., 2015), даже несмотря на использование эмбрионов хорошего качества при переносе здоровым синхронизированным реципиентам, а из рожденных клонов, лишь относительно небольшая часть достаточно здоровы, чтобы прожить дольше нескольких дней (Bang et al., 2015).

Большинство потерь при использовании технологии клонирования (как классического SCNT, так и НМС) связано с его основными этапами: созревание ОКК, реконструирование, активация, раннее развитие эмбрионов. То есть большинство потерь происходит в предимплантационный период или на ранних сроках имплантации (Avisé, 2015; Keefer, 2015). Техника НМС подразумевает манипулирование с ооцитами и эмбрионами лишенными блестящей оболочки, так как удаление *zona pellucida* существенно облегчает и ускоряет отдельные этапы технологии клонирования, что приводит к сравнимому, или даже более высокому уровню рождаемости, чем при использовании традиционного клонирования (Vajta, 2007).

Таблица 3. Сравнение ДНК-профилей по STR-локусам

Животное/локус	Образец №1 (клонированный телёнок)	Образец №2 (корова-донор кариопластов №1310052)	Образец №3 (корова-реципиент №2210438)
Eth3	125, 129	125, 129	129, 129
Cssm66	183, 185	183, 185	189, 189
inra23	208, 210	208, 210	206, 214
BM1818	266, 266	266, 266	262, 266
ilsts6	288, 292	288, 292	292, 294
Tgla227	89, 89	89, 89	89, 89
Tgla126	115, 117	115, 117	115, 117
Tgla122	171, 183	171, 183	161, 163
Sps115	248, 254	248, 254	248, 252
Eth225	148, 150	148, 150	148, 152
Tgla53	160, 162	160, 162	160, 186
Csrm60	92, 98	92, 98	92, 92
Bm2113	135, 135	135, 135	125, 135
Bm1824	188, 188	188, 188	178, 188
Eth10	219, 219	219, 219	217, 219

Рядом исследовательских групп в области клонирования была проведена критическая оценка техники НМС и сообщалось о её преимуществах и недостатках (Verma et al., 2015; Vajta, 2007; Singla et al., 2014; Mahdi, Fakhrisadat, 2012).

В настоящее время с использованием техники НМС, было получено клонированное потомство от различных видов животных, таких как крупный рогатый скот (Vajta et al., 2000; Singla et al., 2014; Thouas, Jones, Trounson, 2003), овцы (Khan et al., 2018) свиньи (Booth et al., 2001; Du et al., 2005), верблюды (Moulavi, Hosseini, 2019) и мыши (Ribas et al., 2005).

Несомненные преимущества новой техники клонирования были продемонстрированы на двух видах сельскохозяйственных животных: на крупном рогатом скоте (Vajta et al., 2003) и свиньях (Du et al., 2005).

Клонирование является мощным инструментом для создания генетически идентичных копий желаемого животного-донора, однако, несмотря на то что за последние годы в области клонирования животных достигнуты определенные успехи, они пока в большей степени носят эмпирический характер, поэтому положительные результаты сильно варьируют от эксперимента к эксперименту. Основной причиной такой нестабильности результатов является недостаточность фундаментальных знаний о глубинных механизмах, обуславливающих процесс репрограммирования кариопластов цитопластами, и факторов, влияющих на этот процесс (Lin et al., 2008).

Частота неудач при клонировании остается достаточно высокой (Ji et al., 2013). Многие клонированные эмбрионы могут развиваться до предимплантационных стадий, но подавляющее большинство из них не способно дать жизнеспособную беременность (Hill et al., 2000). Сообщалось, что несмотря на использование здоровых, фертильных, синхронизированных телок в качестве реципиентов, потеря эмбрионов в начале первого триместра стельности составила 50% и около 80% плодов было абортировано во втором триместре, в основном из-за аномалий плаценты (Lee et al., 2004).

В большинстве работ сообщается о значительных эмбриональных потерях на ранних стадиях развития, примерно в возрасте 30-90 дней стельности (Loneragan et al., 2007) из-за

дисфункции и недоразвития плаценты и её кровеносных сосудов (Edwards et al., 2003). Частота наступления стельности и её сохранность в первом триместре составляет менее половины от обычно ожидаемой. Эмбриональные потери очень высоки и около 80% выкидышей происходят во втором триместре, кроме того, на поздних сроках стельности значительно возрастает вероятность развития плацентарных и фетальных аномалий (Farin, Piedrahita, Farin, 2006). Основной причиной потерь в третьем триместре являются гидроаллантоис и водянка плода, обычно приписываемые недостаточной плацентации (Loi et al., 2006). Так же описаны случаи потери стельностей из-за гипоксии плода, поскольку у клонированных животных снижен размер плацентома, что ограничивает транспорт питательных веществ и кислорода от матери к плоду (Miglino et al., 2007).

Аномалии плаценты являются частой патологией, которая обнаруживается у клонированных животных. По мнению ряда учёных, ранние эмбриональные потери связаны именно с недоразвитием плаценты (Hill, 2002). Сообщалось, что у клонированных животных наблюдается аномальное развитие аллантоиса и недоразвитие кровеносных сосудов плаценты, количество плацентомов у таких животных значительно снижено (Miglino et al., 2007), и, по-видимому, приводит к снижению плацентарного газообмена, поскольку у клонированных плодов на поздних сроках беременности регистрируется гипоксия (Loi et al., 2006).

После завершения внутриутробного развития клонированные животные сталкиваются с большими затруднениями, приспособляясь к жизни *ex utero* (Garry et al., 1996). Телята могут выглядеть как их нормальные сверстники, однако генетически они будут отличны от них, и эти различия обусловлены эпигенетическими аномалиями, приобретенными в ходе ядерного репрограммирования (Ji et al., 2013). У клонированных животных обнаруживаются многие гестационные и неонатальные аномалии (Lee et al., 20004), что может быть связано с ненадлежащей экспрессией и, вероятно, неполным репрограммированием импринтированных генов (Wrenzycki et al., 2004). Согласно другим сообщениям, различия обусловлены аномалиями в длине теломера, экспрессии генов или паттернов метилирования генома (Hill, 2002).

Несмотря на то, что постнатальная жизнеспособность клонированного потомства снижена, наблюдается значительная индивидуальная изменчивость от животного к животному (Kruip, den Daas, 1997). В основном в послеотельном периоде у телят наблюдались проблемы с дыхательной (van Wagtendonk-de Leeuw et al., 2000), сердечно-сосудистой и центральной нервной системами (Farin, Piedrahita, Farin, 2006). Эти патологии, вероятнее всего, связаны с ненадлежащим эпигенетическим репрограммированием донорского генома, приводящим к несоответствующим паттернам экспрессии генов во время развития клона (Keefer, 2015; Lin et al., 2008).

«Синдром большого потомства» — пример фенотипической аномалии у клонированных животных (Bertolini, Anderson, 2002; Ibtisham et al., 2016; Keefer, 2015), которая увеличивает вероятность осложнений при организации отёла, вплоть до потери теленка и коровы (Garry et al., 1996).

Обычно продолжительность стельности клонированным теленком довольно затягивается, что происходит из-за снижения транзиторной функции плаценты для кортизола плода или из-за отсутствия высвобождения АКТГ плодом (Wells, 2003). Гормональный дисбаланс и большие размеры плода могут приводить к дистоции и к связанным с ней проблемам в послеотельный период.

У многих клонированных телят значительно снижена постнатальная жизнеспособность (De et al., 2011). Доля рожденных клонированных телят, которые выживают в течение

длительного времени, варьирует от 47 до 80% (Wells, 2005). При рождении клонированные телята и ягнята обычно демонстрируют признаки дистресса. Согласно исследованиям, нарушения, связанные с дисфункцией сосудистого русла, такие как легочная гипертензия, отёки и плевральные выпоты, также являются причиной послеродовой смертности. Помимо этого, гемодинамические нарушения вызывают капиллярный застой в альвеолах и тромбоз легочной артерии. Данные нарушения, вероятно, ингибируют полное раскрытие альвеол и вызывают дыхательную недостаточность, которая обуславливает низкую постнатальную выживаемости клонированных телят (Maïorka et al., 2015). Одной из причин смертности клонированных телят в постнатальный период является сепсис, развивающийся вследствие расширенных пупочной артерии и вены (Edwards et al., 2003).

Заключение

В результате проведенной работы, впервые в России, методом Hand-made Cloning получена клонированная телочка голштинской породы. Технология клонирования методом НМС является эффективным вариантом SCNT и может быть использована в условиях молочно-товарной фермы. Методика НМС не лишена некоторых недостатков, присущих технологии клонирования в целом, и поэтому она требует дальнейшего усовершенствования, однако в долгосрочной перспективе НМС является простым, технологичным и коммерчески доступным методом получения клонированного потомства крупного рогатого скота.

Авторами разработаны и апробированы технологические усовершенствования метода НМС, такие как применение монокристаллического микроножа с атомарно острой заточкой и электропоратор с оптимизированной для НМС формой и последовательностью импульсов. Использование метода НМС может стать не только ценным инструментом в племенной работе по тиражированию высокоценных животных и усилению селекционного эффекта, но также может быть использован для сохранения исчезающих пород скота и поддержания генетического разнообразия.

Благодарности

Авторы выражают особую благодарность сотрудникам отдела технического сервиса клиники «АльтраВита» и лично Демину Ивану Павловичу за оказанную техническую помощь при проведении данного исследования, в особенности, за проектирование и разработку электропоратора.

Список литературы

1. Кириенко К.В., Апрышко В.П., Яковенко С.А. Технология клонирования сельскохозяйственных животных методом hand-made cloning (обзор литературы). // Актуальные вопросы ветеринарной биологии. 2023. Т. 4, № 60. С. 15-22.
2. Akshey Y.S., Malakar D., De A.K., Jena M.K., Garg S., Dutta R., Pawar S. K., Mukesh M. Hand-made cloned goat (*Capra hircus*) embryos—a comparison of different donor cells and culture systems. *Cell. Reprogram.* 2010. 12: 581-588. doi: 10.1089/cell.2009.0120
3. Avise J.C. Evolutionary perspectives on clonal reproduction in vertebrate animals. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2015 112(29): 8867-8873.

4. Bang J.I, Jin J.I, Ghanem N, et al. Quality improvement of transgenic cloned bovine embryos using an aggregation method: Effects on cell number, cell ratio, embryo perimeter, mitochondrial distribution, and gene expression profile. *Theriogenology*. 2015, 84(4): 509–523.
5. Bertolini M, Anderson G.B. The placenta as a contributor to production of large calves. *Theriogenology*. 2002. 57(1): 181-187.
6. Booth P.J., Tan S.J., Holm P., Callesen H. Application of the zona-free manipulation technique to porcine somatic nuclear transfer. *Cloning Stem Cells* . 2001. **3**: 191-197. doi: 10.1089/15362300152725909
7. De Bem T.H, Chiaratti M.R, Rochetti R. et al. Viable calves produced by somatic cell nuclear transfer using meiotic-blocked oocytes. *Cell Reprogram*. 2011. 13(5): 419-429.
8. Du Y., Kragh P. M., Zhang Y., Li J., Schmidt M. et al. Piglets born from handmade cloning, an innovative cloning method without micromanipulation. *Theriogenology*. 2007, 68: 1104-1110. doi: 10.1016/j.theriogenology.2007.07.021
9. Du Y., Kragh, P.M., Zhang X., Purup S., Yang H., Bolund L. Vajta, G. High overall in vitro efficiency of porcine handmade cloning (HMC) combining partial zona digestion and oocyte trisection with sequential culture. *Cloning Stem cells*. 2005. 7(3), 199-205. doi: 10.1089/clo.2005.7.199
10. Edwards J.L, Schrick F.N, McCracken M.D. 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.
11. Farin P.W., Piedrahita J.A., Farin C.E. Errors in development of fetuses and placentas from in vitro-produced bovine embryos. *Theriogenology*. 2006. 65(1): 178-191.
12. Garry F.B., Adams R., McCann J.P. et al. Postnatal characteristics of calves produced by nuclear transfer cloning. *Theriogenology*. 1996. 45(1): 141-152.
13. George A., Sharma R., Singh K. P., Panda S. K., Singla S. K., Palta P., Manik R., Chauhan M. S. Production of cloned and transgenic embryos using buffalo (*Bubalus bubalis*) embryonic stem cell-like cells isolated from in vitro fertilized and cloned blastocysts. *Cell. Reprogram*. 2011. 13: 263-272. doi: 10.1089/cell.2010.0094
14. Hill J.R., Burghardt R.C., Jones K., et al. Evidence for placental abnormality as the major cause of mortality in first-trimester somatic cell cloned bovine fetuses. *Biol Reprod*. 2000. 63(6): 1787-1794.
15. Hill J.R. Abnormal in utero development of cloned animals: implications for human cloning. *Differentiation*. 2002. 69(4–5): 174-178.
16. Ibtisham F., Niu Y., Wang Z et al. Animal cloning drawbacks an-overview. *J Dairy Vet Anim Res*. 2016. 3(4): 139-143. DOI: 10.15406/jdvar.2016.03.00087
17. Ji Q., Zhu K., Liu Z. et al. Improvement of porcine cloning efficiency by trichostain A through early-stage induction of embryo apoptosis. *Theriogenology*. 2013. 79(5): 815-823.
18. Keefer C.L. Artificial cloning of domestic animals. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015. 112(29): 8874-8878.
19. Khan S, Tali M, Khan A, Bhat S, Ashraf A, Bhat MH, Khan F, Shah RA. Comparison of efficiency of in vitro cloned sheep embryo production by conventional somatic cell nuclear transfer and handmade cloning technique. *Reprod Domest Anim*. 2018 Apr;53(2):512-518. DOI: 10.1111/rda.13138.
20. Kruip A.M., den Daas J.H.G. In vitro produced and cloned embryos: Effects on pregnancy, parturition and offspring. *Theriogenology*. 1997.47(1): 43-52.
21. Lagutina I., Lazzari G., Duchi R., Colleoni S., Ponderato N., Turini P., Crotti G., Galli C. Somatic cell nuclear transfer in horses: effect of oocyte morphology, embryo reconstruction method and donor cell type. *Reproduction*. 2005. 130: 559-567. DOI:: 10.1530/rep.1.00772
22. Lanza R.P., Cibelli J.B., Blackwell C., et al. Extension of cell life-span and telomere length in animals cloned from senescent somatic cells. *Science*. 2000. 288: 665+669. DOI: 10.1126/science.288.5466.665
23. Lee R.S., Peterson A.J., Donnison M.J., et al. Cloned cattle fetuses with the same nuclear genetics are more variable than contemporary half-siblings resulting from artificial insemination and exhibit fetal and placental growth deregulation even in the first trimester. *Biol Reprod*. 2004. 70(1): 1-11.

24. Li S., Kang J.D., Jin J.X. et al. Effect of demecolcine-assisted enucleation on the MPF level and cyclin B1 distribution in porcine oocytes. *PLoS One*. 2014. 9: e91483. DOI: 10.1371/journal.pone.0091483
25. Lin L., Li Q., Zhang L et al. Aberrant epigenetic changes and gene expression in cloned cattle dying around birth. *BMC Dev Biol*. 2008. 8: 14.
26. Loi P, Clinton M, Vackova I, et al. Placental abnormalities associated with post-natal mortality in sheep somatic cell clones. *Theriogenology*. 2006. 65(6): 1110-1121.
27. Lonergan P., Evans A.C., Boland E. et al. Pregnancy and fetal characteristics after transfer of vitrified in vivo and cloned bovine embryos. *Theriogenology*. 2007. 68(8): 1128-1137.
28. Mahdi E., Fakhrisadat H. Handmade cloning: an alternative technique for somatic cell nuclear transfer. *Annals of Biological Research*. 2012. 3: 3043-3048.
29. Maiorka P.C., Favaron P.O., Mess A.M. et al. (2015) Vascular alterations underlie developmental problems manifested in cloned cattle before or after birth. *PLoS ONE* 10(1): e0106663. DOI: 10.1371/journal.pone.0106663
30. Miglino M.A., Pereira F.T., Visintin J.A. et al. Placentation in cloned cattle: Structure and microvascular architecture. *Theriogenology*. 2007. 68(4): 604-617.
31. Moulavi F., Hosseini S.M. Development of a modified method of handmade cloning in dromedary camel. *PLoS One*. 2019. 14(4): e0213737. DOI: 10.1371/journal.pone.0213737
32. Oback B., Wiersema A.T., Gaynor P., Laible G. et al. Cloned cattle derived from a novel zona-free embryo reconstruction system. *Cloning Stem Cells*. 2003. 5: 3-12. DOI: 10.1089/153623003321512111
33. Ribas, R., Oback, B., Ritchie, W., Chebotareva, T., Clarke, C., Wilmut, I. Development of a zona-free method of nuclear transfer in the mouse. *Cloning Stem Cells*, 2005, 7, 126-138. DOI: 10.1089/clo.2005.7.126
34. Saini M., Selokar N.L., Raja A.K. et al. Theriogenology effect of donor cell type on developmental competence, quality, gene expression, and epigenetic status of interspecies cloned embryos produced using cells from wild buffalo and oocytes from domestic buffalo. *Theriogenology*. 2015. 84(1): 101.e1-108.e1.
35. Singla S.K., Raja A., Nala N., Chauhan M.S., Manik R.S., Palta P. Hand-made cloning: a guide for cloning water buffaloes. *MGM J. Med. Sci*. 2014. 1(3): 126-131.
36. Tani T., Shimada H., Kato Y., Tsunoda Y. Demecolcine-assisted enucleation for bovine cloning. *Cloning Stem Cells* 2006. 8: 61–66. doi: 10.1089/clo.2006.8.61
37. Tatham B. G., Dowsing A. T., Trounson A. O. 1995. Enucleation by centrifugation of in vitro-matured bovine oocytes for use in nuclear transfer. *Biol. Reprod*. 53: 1088-1094. DOI: 10.1095/biolreprod53.5.1088
38. Thouas, G.A., Jones G.M., Trounson A.O. The GO system – a novel method for microculture for in vitro development of mouse zygotes to the blastocyst stage. *Reproduction*. 2003. 126(2): 161-169. DOI: 10.1530/rep.0.1260161
39. Vajta G., Bartels P., Joubert J., de la Rey M., Treadwell R., Callesen H. Production of a healthy calf by somatic cell nuclear transfer without micromanipulators and carbon dioxide incubators using the Handmade Cloning (HMC) and the Submarine Incubation System (SIS). *Theriogenology* 2004. 62: 1465-1472. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2004.02.010
40. Vajta G., Kragh P. M., Mtango N. R., Callesen H. 2005. Hand-made cloning approach: potentials and limitations. *Reprod. Fertil. Dev*. 17: 97–112. DOI: 10.1071/RD04116
41. Vajta G., Lewis I.M., Hyttel P., Thouas G.A., Trounson A.O. Somatic cell cloning without micromanipulators. *Cloning*. 2001. 3: 89-95. DOI: 10.1089/15204550152475590
42. Vajta G., Lewis I.M., Trounson A.O. et al. Handmade somatic cell cloning in cattle: analysis of factors contributing to high efficiency in vitro. *Biol. Reprod*. 2003. 68: 571-578. DOI: 10.1095/biolreprod.102.008771
43. Vajta G., Peura T.T., Holm P., Páldi A., Greve T., Trounson A. O., Callesen H. New method for culture of zona-included or zona-free embryos: the Well of the Well (WOW) system. *Mol. Reprod. Dev*. 2000. 55: 256–264. DOI: 10.1002/(SICI)1098-2795(200003)55:3<256::AID-MRD3>3.0.CO;2-7

44. Vajta G. Handmade cloning: the future way of nuclear transfer? *Trends Biotechnol.* 2007. 25: 250-253. doi: 10.1016/j.tibtech.2007.04.004
45. Vajta, G., Lewis, I.M., Tecirlioglu, R.T. (2006). Handmade Somatic Cell Cloning in Cattle. In: Verma, P.J., Trounson, A.O. (Eds) Nuclear Transfer Protocols. Methods in Molecular Biology™, Vol, 348. Humana Press. https://doi.org/10.1007/978-1-59745-154-3_12
46. Van Wagtendonk-de Leeuw A.M., Mullaart E., de Roos A.P. et al. Effects of different reproduction techniques: AI MOET or IVP, on health and welfare of bovine offspring. *Theriogenology.* 2000. 53(2): 575-597.
47. Verma G., Arora J.S., Sethi R.S., Mukhopadhyay C.S., Verma R. Handmade cloning: recent advances, potential and pitfalls. *J. Anim. Sci. Biotechnol.* 2015. 6: 43. DOI: 10.1186/s40104-015-0043-y
48. Wells D.N. Animal cloning: problems and prospects. *Rev Sci Tech.* 2005. 24(1): 251-264.
49. Wells DN. Cloning in livestock agriculture. *Reprod Suppl.* 2003. 61: 131-150.
50. Wrenzycki C., Herrmann D., Lucas-Hahn A. et al. Gene expression patterns in in vitro-produced and somatic nuclear transfer-derived preimplantation bovine embryos: relationship to the large offspring syndrome? *Anim. Reprod. Sci.* 2004. 83: 593-603.
51. Yang C.Y., Pang C.Y., Yang B.Z., Li R.C., Lu Y.Q., Liang X.W. Optimization of cryopreservation of buffalo (*Bubalus bubalis*) blastocysts produced by in vitro fertilization and somatic cell nuclear transfer. *Theriogenology.* 2012. 78: 1437-1445. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2012.05.032
52. Zhang P., Liu P., Dou H., Chen L., Chen L., Lin L., Tan P., Vajta G., Gao J., Du Y., Ma R. Z. Handmade cloned transgenic sheep rich in omega-3 Fatty acids. *PLoS One.* 2013. 8: e55941. DOI: 10.1371/journal.pone.0055941

References (for publications in Russian)

Kirienko K.V., Apyrshko V.P., Yakovenko S.A. [Technology of cloning farm animals using the hand-made cloning method: a review]. *Aktual'nye voprosy veterinarnoi biologii* (Current issues in veterinary biology). 2023. 4: 15-22

UDC 636.2.055:591.3

Approbating progressive technology of cattle cloning

²Kirienko K.V., ^{2,5}Mironova A.G., ¹Ikonomov P.G., ^{2,3}Apyrshko V.P., ¹Bondarenko M.S., ¹Grishin D.S., ¹Zavodovskaya M.S., ¹Martyn V.F., ¹Vasilieva O.V., ¹Semenova E.I., ¹Shokirova N.S., ⁶Krashennnikov M.E., ^{2,4}Yakovenko S.A.

¹Biotechnological laboratory (Altragen LLC), Ust-Labinsk, Krasnodar oblast); ²AltraVita Human Reproduction Clinic (ECO CENTER LLC), Moscow; ^{3,4} Moscow State University; ⁵Emanuel Institute of Biochemical Physics. Moscow; ⁶Scientific and educational resource center "Cell Technologies". Patrice Lumumba Peoples' Friendship University, Moscow. Russian Federation

ABSTRACT. Somatic cell nuclear transfer (SCNT) was up to date the most effective and viable method for propagating valuable or endangered animals. More than 99% of embryos or living offspring previously reported were obtained using a micromanipulation approach, i.e. using traditional SCNT. With hand-made cloning (HMC), the procedures of oocyte enucleation and embryo reconstruction are carried out in the absence of the *zona pellucida*, and all manipulations are carried out without the use of micromanipulators. To date, using HMC, positive results have been obtained in the world in obtaining cloned offspring from cattle, buffaloes, sheep, pigs and horses. The aim of this work

is to test the technology of cloning cattle using the HMC method. The selection of materials for the study and the organization of calving were carried out on the basis of the dairy farm using Holstein cows. Cow ovaries were obtained from a local slaughterhouse within 20–30 minutes after slaughter and delivered to the laboratory within 3 hours. The effectiveness of the main stages of cloning technology using the HMC method was studied: maturation of cattle oocytes *in vitro*, followed by their use as cytoplasm donors; obtaining a culture of somatic cells from a highly productive Holstein cow and using it as karyoplast donor cells; activation, cultivation and transplantation of reconstructed embryos into a recipient cow, genetic testing of the resulting offspring and cow recipient. As a result of the study, for the first time in the Russian Federation, a cloned Holstein heifer was obtained using the HMC method. The results obtained indicate the possibility of practical use of HMC technology to produce offspring of highly productive cows.

Keywords: cattle, manual cloning, oocyte enucleation, embryo reconstruction, blastocyst production, cloned offspring, genetic testing.

Problemy biologii produktivnykh zhivotnykh (Productive Animal Biology), 2024. 2: 31-44.

Поступило в редакцию: 10.04.2024

Получено после доработки: 15.06.2024

Сведения об авторах

Кириенко Константин Владимирович; к.б.н.; ведущий эмбриолог; kkiriyenko@rambler.ru 8(967)167-79-23;

Миронова Анна Геннадиевна; асп., .вед. эмбриолог;; agm90@mail.ru; +7(916)167-00-88;

Икономов Петр Геннадьевич; гл. эмбриолог.; Ikonomov82@bk.ru; +7(918)415-42-34;

Апрышко Валентина Петровна; зав. лаб., инж.; supermycolog@mail.ru; +7(910)409-28-13;

Бондаренко Мария Сергеевна; вет. врач-эмбриолог; maryab@bk.ru; +7(918)619-70-04;

Гришин Давид Станиславович; вет. врач-эмбриолог; davidgrish@mail.ru; +7(918)153-32-30;

Заводовская Маргарита Сергеевна; вет. врач-эмбриолог; MargaritaZav1230@yandex.ru;

Мартын Виктория Фёдоровна; вет.врач-эмбриолог; Martynvika1999@yandex.ru;

Васильева Олеся Валерьевна; вет. врач-эмбриолог; olesya.vasileva.2022@inbox.ru;

Семенова Екатерина Игоревна; вет врач-эмбриолог; katya-sem-99@mail.ru; +7(953)102-78-57;

Шокирова Нозанин Субхонкуловна; вет. врач-эмбриолог; shokirova.noza@mail.ru;

Крашенинников Михаил Евгеньевич; д.б.н., вед.н.с.; krashen@rambler.ru; +7(903)593-29-84;

Яковенко Сергей Александрович; к.ф.-м.н.; с.н.с, ген. дир., altravita@mail.ru; +7(903)790-90-18