

ВЛИЯНИЕ СОСТАВА СРЕДЫ ЭНУКЛЕАЦИИ ООЦИТОВ И ПЕРЕНОСА ЯДЕР ДОНОРСКИХ КЛЕТОК НА ЭФФЕКТИВНОСТЬ СОМАТИЧЕСКОГО КЛОНИРОВАНИЯ ОВЕЦ (*OVIS ARIES*)

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

*ФИЦ животноводства — ВИЖ им. Л.К. Эрнста, Подольск-Дубровицы
Московской обл., Российская Федерация*

Для–повышения результативности соматического клонирования решающее значение имеет выработка адекватных условий для каждой стадии технологии переноса ядер соматических клеток (somatic cell nuclear transfer; SCNT). Цель исследования – оценка влияния фетальной бычьей сыворотки (ФБС) и бычьего сывороточного альбумина (БСА) в среде энуклеации ооцитов и переноса ядер соматических клеток на получение клонированных эмбрионов овец. Ооцит-кумулюсные комплексы, полученные из яичников овец, культивировали в течение 19-23 ч в среде созревания. После очищения от клеток кумулюса проводили селекцию ооцитов, ориентируясь на наличие у них первого полярного тельца (ППТ). Ооциты энуклеировали аспирацией ППТ и прилежащей к нему цитоплазмы. Соматические клетки (СК) инъецировали в ППТ энуклеированного ооцита (перенос ядра) микропипеткой, используемой ранее для биопсии ППТ. Процедуру NT (энуклеация и перенос ядра) проводили в двух вариантах среды ТС-199: с 5% ФБС и 0,3 % БСА. Полученные комплексы ооцит/СК объединяли посредством электрослияния. Цитогриды активировали иономицином, инкубировали с 6-диметиламинопурином и циклогексимином и культивировали в течение 48 часов. Внесение БСА в среду для NT приводило к снижению эффективности слияния ооцитов и СК с 39 до 24% ($P<0,001$) и дробления полученных цитогридов с 58 до 39% ($P<0,05$) по сравнению с ФБС. При длительности микроманипуляций в пределах 40 минут и менее наблюдалось преимущество ФБС по параметрам формирования ($P<0,05$) и дробления цитогридов ($P<0,05$) над БСА в составе среды для NT. При продолжительности процедуры NT свыше 40 минут межгрупповые различия по эффективности слияния и эмбрионального развития отсутствовали. Заключение, что ФБС является предпочтительным источником белковых макромолекул на этапе NT соматического клонирования при продолжительности данной процедуры в пределах 40 и менее минут.

Ключевые слова: овца, соматическое клонирование, ооцит, соматическая клетка, фетальная бычья сыворотка, бычий сывороточный альбумин, слияние, эмбриональное развитие.

Проблемы биологии продуктивных животных, 2025. 4: 84-92.

Введение

Используемые обозначения: БСА – бычий сывороточный альбумин; NT – энуклеация и перенос ядра; ОКК – ооцит-кумулюсные комплексы; ППТ – первое полярное тельце; СК – соматические клетки; ФБС – фетальная бычья сыворотка; ФФБ – фетальные фибробласты; IVМ (in vitro maturation) – созревание ооцитов *in vitro*; IVС (in vitro culture) – ; SCNT (somatic cell nuclear transfer) – перенос ядер соматических клеток.

Соматическое клонирование (somatic cell nuclear transfer, SCNT) – вспомогательная репродуктивная технология (assisted reproductive technology, ART), впервые реализованная на практике еще в 1996 году, когда весь мир облетела новость о рождении овечки Долли, первого клонированного животного, воссозданного из культивируемой дифференцированной

соматической клетки (СК) (Wilmut et al., 1997; Samiec, 2024). Получение клонированных эмбрионов – сложная многоэтапная процедура, которая включает в себя *in vitro* созревание ооцитов (IVM), синхронизацию клеточного цикла донорских клеток, удаление ядерного материала у созревшего ооцита (энуклеация) и замену его на генетический материал соматической клетки (перенос ядра), активацию полученных цитогрибидов и эмбриональное культивирование (*in vitro culture*, IVC) (Loi et al., 2021; Swegen et al., 2023). SCNT, в первую очередь, выступает объектом интереса научного сообщества в качестве инструмента для сохранения биоразнообразия, геномного редактирования и биомедицинских исследований (Iqbal et al., 2021). К настоящему времени получено клонированное потомство более чем от 20 видов млекопитающих, в том числе от вымирающих и гибридных животных (Gambini et al., 2022).

Однако, несмотря на высокую практическую востребованность, эффективность технологии SCNT ещё остаётся на низком уровне (Srirattana et al., 2022). В частности, у домашней овцы (*Ovis aries*) она составляет, по разным данным, от 3,4 до 5,9% (Keefe, 2015). Одна из ключевых причин низкой эффективности соматического клонирования — влияние стресс-факторов окружающей среды, вызванных физико-химическими условиями культивирования *in vitro*, на клеточные процессы на каждом из этапов SCNT (Cordova et al., 2017). В ходе энуклеации и переноса ядра ооциты и СК длительное время находятся вне инкубатора и подвергаются дополнительному клеточному стрессу, вызванному микрохирургическими процедурами (Sun et al., 2023). Для поддержания жизнедеятельности клеток при микроманипуляциях особую важность приобретает состав культуральной среды, в которой они в это время находятся (Bae et al., 2015). Одним из основных компонентов сред в системах *in vitro* культивирования ооцитов и эмбрионов млекопитающих является источник белков (Gardner, 2008; Ghaedrahmati et al., 2024). По разным данным, развитие эмбрионов в условиях *in vitro* может зависеть от типа белка, добавляемого в среду для IVM и IVC (Ghaedrahmati et al., 2024; Gomez, Diez, 2000; Kussano et al., 2023). Большинство используемых культуральных сред содержат в своём составе источники белков: фетальную бычью сыворотку (ФБС) или бычий сывороточный альбумин (БСА) (Mastromonaco et al., 2004; Wang et al., 2012). ФБС богата белками, метаболитами и эмбриотропными факторами, способствующими прикреплению, росту, пролиферации соматических клеток и развитию эмбрионов (Van Langendonck et al., 1997; Chelladurai et al., 2021). При этом внесение ФБС в манипуляционную среду может приводить к повышению адгезивности донорских СК в течение NT, что затрудняет и удлиняет продолжительность этой процедуры из-за прилипания СК друг к другу и микроинструментам (Лопухов и др., 2025; Singina et al., 2024). БСА, в свою очередь, рассматривается в качестве наиболее предпочтительного альтернативного варианта животной сыворотки в эмбриональных технологиях, поскольку альбумин является физиологическим компонентом сыворотки и обладает противотоксичными и антиоксидантными свойствами, а в его присутствии СК теряют стремление к прикреплению (Lee et al., 2014; Mesalam et al., 2019). Вместе с тем, в литературных данных отсутствуют сравнительные исследования влияния белковых макромолекул ФБС и БСА в среде для NT (энуклеации ооцитов и переноса в перивителлиновое пространство полученных цитопластов донорской соматической клетки) на результативность соматического клонирования.

Цель исследования - сравнительный анализ влияния ФБС и БСА на этапе энуклеации и переноса ядер соматических клеток для выявления факторов, влияющих на эффективность получения клонированных эмбрионов овец.

Материалы и методы

Работа была выполнена на базе лаборатории экспериментальной эмбриологии ВИЖ. Во всех экспериментах, за исключением отдельно указанных случаев, использовались реактивы фирмы 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 проводились при 37 °С.

Для работы по подготовке донорских клеток (кариопластов) была использована среда DMEM, 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 (ФФБ) овец IV-V пассажа. За несколько дней до проведения 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 таковую аналогичного состава, но с содержанием ФБС 0,5% и дополнительно культивировали еще в течение 48 ч для остановки клеточного цикла ФФБ на стадии G0/G1. Окончание периода инкубации в условиях сывороточного голодания совпадало с началом эксперимента по NT и начиналось с подготовки суспензии клеток согласно протоколу, описанному ранее (Singina et al., 2020): среду, в которой происходило культивирование клеток, заменяли раствором трипсин/ЭДТА, инкубировали при 37 °С в течение 7 мин., после чего открепившиеся ФФБ переносили в пробирки со средой TC-199, дополненной 50 мкг/мл гентамицина и 0,3% бычьего сывороточного альбумина. Клетки осаждали центрифугированием при 300 g в течение 7 мин., супернатант удаляли, а осадок ресуспендировали в среде аналогичного состава до использования при NT.

Источником ооцитов (цитопластов) 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-кумулюсных комплексов (ОКК), селекция пригодных для культивирования ОКК и их инкубация с целью созревания (*in vitro* maturation, IVM) проводились по ранее описанному протоколу (Singina et al., 2023). Через 19-23 ч IVM ооциты освобождали от клеток кумулюса, после чего проводили селекцию тех, которые достигли метафазы II мейоза (созрели *in vitro*), т.е. имели в своем перивителлиновом пространстве ППТ и в которых отсутствовали признаки дегенерации и лизиса.

Микрохирургические процедуры с клетками выполняли с использованием инвертированного микроскопа Nikon Eclipse Ti (Nikon Corporation, Япония), совмещённого с системой лево- и правосторонних манипуляторов грубой (механические) и точной (масляно-гидравлические) настройки Narishige (Япония), а также масляно-гидравлическими инжекторами. Для NT ооциты группами по 15-20 клеток помещали в капли среды TC-199 с 5% ФБС или TC-199 с 0,3% БСА объёмом 15 мкл, нанесённых на дно чашки Петри диаметром 60 мм и покрытых лёгким минеральным маслом. В те же капли вносили по 1-2 мкл суспензии ФФБ. Схема процедуры NT представлена на рис. 1.

Удаление ППТ и перенос единичных фибробластов проводили, используя микропипетку с внутренним диаметром 13-15 мкм. Ооциты фокусировали с помощью удерживающей пипетки 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 зону пеллюциды в месте локализации ППТ, хромосомы яйцеклетки удаляли аспирацией ППТ и 10-20% прилежащей 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 подсчёт их количества относительно общего числа ооцитов с ППТ, использованных для NT.

С целью интеграции содержимого СК в ооцит, отобранные клеточные комплексы подвергали электрослиянию, используя мультипоратор фирмы Eppendorf (Германия) и

методику, описанную нами ранее (Singina et al., 2024). После выполнения электрослияния комплексы цитопласт/кариопласт хранили в среде ТС-199, содержащей 10% ФБС, в условиях инкубатора. Через 60 мин. инкубации проводили отбор образовавшихся цитогридов, которые идентифицировали по отсутствию донорской клетки в перивителиновом пространстве ооцита.

Неслившиеся комплексы подвергали повторному электрическому воздействию. Результативность слияния оценивали по отношению количества образовавшихся цитогридов к общему числу использованных комплексов ооцит/СК.

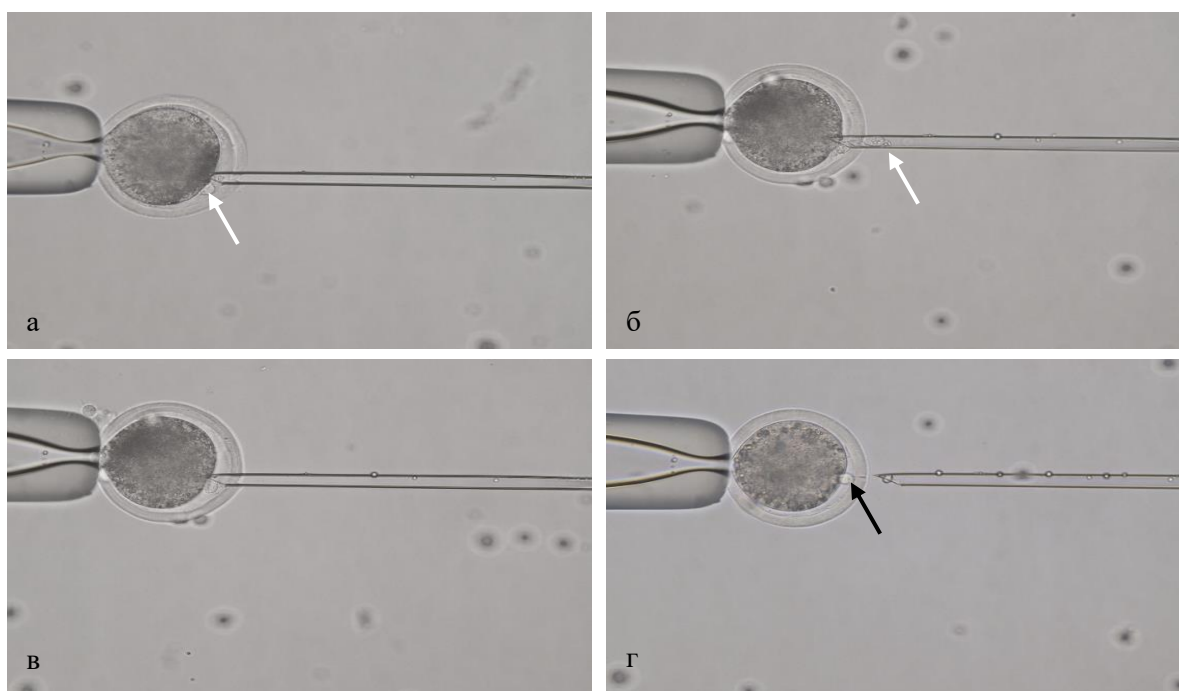


Рисунок 1. Проведение процедуры NT: а-б – энуклеация ооцита с ППТ; в – перенос СК в перивителиновое пространство энуклеированного ооцита; г – получение комплекса ооцит/СК. Микроскоп Eclipse Ti-U (Nikon, Япония). ППТ указано белой стрелкой, СК – чёрной стрелкой. Увеличение $\times 200$.

Цитогриды, полученные в результате электрослияния, обрабатывали иономицином (5 мМ в течение 5 мин), помещали в среду эмбрионального развития, дополненную 2 мМ 6-диметиламинопурина 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 (Singina et al., 2024), после чего определяли количество раздробившихся цитогридов, а также его отношение к исходному количеству комплексов ооцит/СК.

При проведении статистического анализа данных использовали приложение ANOVA в программном пакете SigmaStat (Systat Software, Inc., США). Число независимых опытов в каждой группе было не менее 8.

Результаты и обсуждение

На первом этапе исследований было изучено влияние источника белка в среде для NT (ФБС или БСА) на показатели реконструирования (формирование комплексов энуклеированный ооцит-СК и их слияние) и перехода к раннему эмбриональному развитию (дробление) ооцитов овец. Для NT было отобрано 489 ооцитов (табл. 1) с первым полярным тельцем (ППТ).

Таблица 1. Результативность клонирования у овец в зависимости от содержания в среде проведения процедуры NT фетальной бычьей сыворотки (ФБС) и бычьего сывороточного альбумина (БСА).

Группы, n=8	Число ооцитов с ППТ, n	Получено (
		комплексов ооцит/СК		цитогбридов		раздробившихся цитогбридов	
		n	%	n	%	n	%
ФБС	232	232	100	88	38,9±3,6 ^a	50	58,0±6,5 ^B
БСА	264	257	97,6±1,4	60	23,6±2,1 ^b	25	39,4±5,8 ^Г

Примечания: ооциты с первым полярным тельцем (ППТ) и СК для проведения процедуры NT (энуклеация ооцитов и перенос в перивителлиновое пространство полученных цитопластов донорской соматической клетки) помещали в среду TC-199 с 10% ФБС или 0,3 % БСА; ^{a,b}P<0,001; ^{a,2}P<0,05 по t - критерию.

В группе ФБС все ооциты после энуклеации и имплантации донорской СК сохранили нормальную морфологию, в то время как в группе БСА 97,6 % комплексов ооцит/СК были пригодны к последующему слиянию. Замена белкового компонента среды NT с ФБС на БСА приводила к снижению (P<0,001) выхода клонированных цитогбридов (ооцитов после энуклеации и слияния с СК). Уровень дробления цитогбридов, полученных из ооцитов, подвергнутых процедуре NT в среде с добавлением ФБС, также был выше на (p<0,05), чем в среде с БСА. По соотношению выхода эмбрионов ранних стадий развития к количеству комплексов ооцит/СК выявлена существенная межгрупповая разница (P<0,001): в группе ФБС – 21,1±3,2%, в группе БСА – 9,7±1,7%

На следующем этапе данные эксперимента были интерпретированы с учётом фактора продолжительности процедуры NT (табл. 2), которая в одних случаях не превышала 40 мин, а в других составляла более 40 минут (при максимальном значении - 60 мин).

Таблица 2. Влияние ФБС и БСА в среде реконструирования ооцитов на результативность NT в зависимости от продолжительности процедуры NT

Группы, n=8	Продол- житель- ность NT	Число ооцитов с ППТ, n	Получено					
			комплексов ооцит/СК		цитогбридов		раздробившихся цитогбридов	
			n	%	n	%	n	%
ФБС	≤ 40 мин	129	129	100,0	52	41,3±4,6 ^a	30	59,9±9,9
	> 40 мин	103	103	100,0	36	35,3±5,9 ^{ab}	20	55,0±7,8
БСА	≤ 40 мин	111	109	98,3±1,1	25	23,2±3,0 ^b	10	40,2±11,8
	> 40 мин	153	148	96,9±2,5	35	23,9±3,0 ^b	15	38,6±4,6

Не было обнаружено статистически значимых различий между сравниваемыми вариантами по результативности NT (доля морфологически нормальных комплексов энуклеированный ооцит-СК по отношению к числу ооцитов с ППТ), которая во всех группах находилась на высоком уровне. С другой стороны, при использовании среды с ФБС для процедуры NT в течение 40 и менее мин доля цитогбридов оказалась выше (p<0,05), чем в случае помещения ооцитов и СК в среду с БСА при одинаковой продолжительности NT. Однако, при увеличении продолжительности NT от 40 до 60 мин. существенных различий между белковыми компонентами манипуляционной среды на уровень слияния комплексов

энуклеированный ооцит-СК не наблюдалось. Также ооциты, подвергавшиеся процедуре NT в среде с ФБС или БСА менее 40 мин. или более 40 мин. не различались по компетенции к эмбриональному развитию. Но при этом уровень дробления, оцененный по соотношению раздробившихся цитогридов к числу комплексов энуклеированный ооцит- СК, был ниже ($p < 0,05$) в группе БСА ≤ 40 мин. ($9,0 \pm 2,7$), чем в группе ФБС ≤ 40 мин. ($22,6 \pm 3,4$).

Одним из определяющих факторов результативности получения эмбрионов *in vitro* является состав сред культивирования (Zander-Fox et al., 2023). В ряде исследований было показано, что добавление белковых макромолекул к среде культивирования оказывает благоприятное влияние на эмбриональное развитие (Shirazi et al., 2012; Sciorio, Rinaudo, 2023). В тоже время культивирование в отсутствие источника белка зачастую сопряжено со снижением метаболической активности, скорости развития и качества получаемых эмбрионов (Dique et al., 2023). Большинство из используемых в настоящее время культуральных сред содержат в своем составе белковые добавки – фетальную бычью сыворотку (ФБС) или бычий сывороточный альбумин (БСА) (Mastromonaco et al., 2004; Wang et al., 2012). ФБС дополняет среду культивирования питательными веществами, ростовыми факторами, витаминами и энергетическими субстратами (Tyagi and Mani, 2023). В свою очередь, БСА способен связывать ионы тяжелых металлов, токсины, свободные радикалы, регулируя, таким, образом, окислительно-восстановительный баланс, уровень pH и осмолярность (Belinskaia et al., 2021). При этом, несмотря на широкое использование этих белковых макромолекул на всех этапах соматического клонирования, в том числе IVМ, IVС и NT, в литературе отсутствуют сравнительные данные применения ФБС и БСА в составе культуральной среды во время процедуры NT.

В настоящем исследовании включение ФБС в качестве источника белка в среду для NT приводило к существенному ($P < 0,001$) увеличению уровня слияния энуклеированного ооцита и донорской СК по сравнению с БСА. Как известно, при культивировании СК положительно реагируют на ФБС, которая содержит в том числе и ростовые факторы, необходимые для их роста и пролиферации (Lee et al., 2022). По всей видимости, перенос донорских клеток в среду с ФБС перед началом NT, наряду с усилением адгезивности, может восстанавливать электрические свойства СК и способствовать улучшению их слияния с ооцитами после энуклеации.

Также нами было выявлено влияние источника белка в среде для NT на выход эмбрионов ранних стадий развития. Использование БСА во время процедуры NT снижало долю клонированных эмбрионов, рассчитанную как от цитогридов ($p < 0,05$), так и от комплексов ооцит/СК ($P < 0,001$) по сравнению с ФБС. Весьма вероятно, что присутствие питательных веществ, привносимых с ФБС в среду NT, является более значимым для потенции реконструируемых ооцитов к последующему развитию, чем солибилизирующие свойства БСА. Кроме того, по разным данным, БСА, помимо связывания ионов и мелких молекул, может вводить в культуральные среды нежелательные компоненты (холестерин, стероиды, жирные кислоты), что может приводить к негативному влиянию на клеточные события (Bavister, 1995; Alsabeeh et al., 2018).

При рассмотрении роли источника белка для эффективной энуклеации созревших ооцитов и переноса в них ядер СК в контексте продолжительности процедуры NT, положительный эффект ФБС на результативность слияния ($P < 0,05$) и дробления комплексов ооцит/СК ($P < 0,05$) наблюдался в случаях проведения микроманипуляций в минимальные сроки (не более 40 минут). Можно предположить, что при удлинении NT свыше 40 минут позитивное влияние ФБС на компетенцию реконструированных ооцитов овец к эмбриональному развитию становится менее значимым по причине того, что в течение NT СК оседают и распластаются по дну манипуляционной камеры, а для микроманипуляций вынужденно используются оставшиеся в суспензии клетки, которые могут быть менее пригодными для использования в качестве доноров ядер.

Заключение

ФБС является более предпочтительным источником белка для ооцитов и соматических клеток в период NT по сравнению с БСА. Замена БСА на ФБС в среде для микроманипуляций приводит к улучшению слияния и повышению потенции к эмбриональному развитию реконструированных ооцитов овец. Увеличение продолжительности процедуры NT до более 40 мин нивелирует положительные эффекты ФБС.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования РФ (Государственное задание FGGN-2024-0014).

Список литературы

1. Лопухов А.В., Шедова Е.В., Цындрина 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. <https://doi.org/10.17816/gc638127>.
2. Alsabeeh N., Chausse B., Kakimoto P.A. et al. Cell culture models of fatty acid overload: problems and solutions. // *Biochim. Biophys. Acta. Mol. Cell. Biol. Lipids*. 2018. Vol. 1863. nr 2. P. 143-151. doi: 10.1016/j.bbaliip.2017.11.006.
3. Bae H.K., Hwang I.S., Kim J.Y. et al. Antioxidant treatment during manipulation procedures prevents mitochondrial and DNA damage and enhances nuclear reprogramming of bovine somatic cell nuclear transfer embryos. // *Reprod. Fertil. Dev.* 2015. Vol. 27. P. 1088-1096. <https://doi.org/10.1071/RD14027>.
4. Bavister B.D. Culture of preimplantation embryos: facts and artifacts. // *Hum. Reprod. Update*. 1995. Vol. 1. nr 2. P. 91-148. doi: 10.1093/humupd/1.2.91.
5. Belinskaia D.A., Voronina P.A., Schmurak V.I. et al. Serum albumin in health and disease: esterase, antioxidant, transporting and signaling properties. // *Int. J. Mol. Sci.* 2021. Vol. 22. nr 19. P. 10318. <https://doi.org/10.3390/ijms221910318>.
6. Chelladurai K.S., Christyraj D.S., Rajagolapan K. et al. Alternative to FBS in animal cell culture - An overview and future perspective. // *Heliyon*. 2021. Vol. 7. nr 8. P. e07686. doi: 10.1016/j.heliyon.2021.e07686.
7. Cordova A., King W.A., Mastromonaco G.F. Choosing a culture medium for SCNT and iSCNT reconstructed embryos: from domestic to wildlife species. // *J. Anim. Sci. Technol.* 2017. Vol. 59. P. 24. doi: 10.1186/s40781-017-0149-1.
8. Dique P., Gomez E., Diaz E. et al. Use of two replacements of serum during bovine embryo culture in vitro. // *Theryogenology*. 2003. Vol. 59. nr 3-4. P. 889-899. doi: 10.1016/s0093-691x(02)01134-2.
9. Gambini A., Briski O., Canel N.G. State of the art of nuclear transfer technologies for assisting mammalian. // *Mol Reprod Dev.* 2022. Vol. 89. nr 5-6. P. 230-242. <https://doi.org/10.1002/mrd.23615>
10. Gardner D.K. Dissection of culture media for embryos: the most important and less important components and characteristic. // *Reprod. Fertil. Dev.* 2008. Vol. 20. P. 9-18. doi: 10.1071/rd07160
11. Ghaedrahmati A., Mamouei M., Zandi M. et al. Low serum concentration in ovine embryo culture media. // *gene cell and tissue*. 2024. Vol. 11. nr 3. P.e146911. <https://doi.org/10.5812/gct-146911>.
12. Gomez E., Diez C. Effect of glucose and protein sources on bovine embryo development in vitro. // *Anim. Reprod. Science*. 2000. Vol. 58. nr 1-2. P. 23-37. [https://doi.org/10.1016/S0378-4320\(99\)00078-0](https://doi.org/10.1016/S0378-4320(99)00078-0)
13. Iqbal A., Ping J., Ali S. et al. Conservation of endangered species through somatic cell nuclear transfer (SCNT). // *Conservation Genet. Resour.* 2021. Vol. 13. P. 349-357. <https://doi.org/10.1007/s12686-021-01204-9>
14. Keefer C.L. Artificial cloning of domestic animals. // *Devel. Biol.* 2015. Vol. 112. nr 29. P. 88748878. <https://doi.org/10.1073/pnas.1501718112>.
15. Kussano N.R., De Oliveira Leme L., Dode M.A.N. Protein source in maturation media affects gene expression in cumulus cells and embryo development in cattle. // *Anim. Biotech.* 2023. Vol. 34. nr 3. P. 1247-1260. <https://doi.org/10.1080/10495398.2021.2019755>
16. Lee D.Y., Lee S.Y., Yun S.H. et al. Review of the current research on fetal bovine serum and the development of cultured meat. // *Food. Sci. Anim. Resour.* 2022. Vol. 42. nr 5. P. 775-799. doi:10.5851/kosfa.2022.e46.
17. Lee H., Lee Y., Park B. et al. Detrimental effect of bovine serum albumin in a maturation medium on embryonic development after somatic cell nuclear transfer in pigs. // *J. Embryo. Transf.* 2014. Vol. 29. nr 4. P. 361-368. <https://doi.org/10.12750/JET.2014.29.4.361>

18. Loi P., Palazzese L., Augusto P. et al. 25th Anniversary of cloning by somatic-cell nuclear transfer. Scientific and technological approaches to improve SCNT efficiency in farm animals and pets. // *Reproduction*. 2021. Vol. 162. nr 1. P. 33-43. doi: 10.1530/REP-20-0653
19. Mastromonaco G.F., Semple E., Robert C. et al. Different culture media requirements of ivf and nuclear transfer bovine embryos. // *Reprod. Dom. Anim.* 2004. Vol. 39. P. 462-467. doi: 10.1111/j.1439-0531.2004.00548.x
20. Mesalam A.A., Lee K.L., Khan I. et al. Combination of bovine serum albumin with insulin–transferrin–sodium selenite and/or epidermal growth factor as alternatives to fetal bovine serum in culture medium improves bovine embryo quality and trophoblast invasion by induction of matrix metalloproteinases. // *Reprod. Fertil. Dev.* 2019. Vol. 31. nr. 2. P. 333-346. <https://doi.org/10.1071/RD18162>
21. Samiec M. Molecular mechanisms of somatic cell cloning and other assisted reproductive technologies in mammals: which determinants have been unraveled thus far? Current Status, Further Progress and Future Challenges. // *Int. J. Mol. Sci.* 2024. Vol. 25. nr 24. P. 13675. <https://doi.org/10.3390/ijms252413675>
22. Sciorio R., Rinaudo P. Culture conditions in the IVF laboratory: state of the ART and possible new directions. // *J. Assist. Reprod. Genet.* 2023. Vol. 40. P. 2591-2607. <https://doi.org/10.1007/s10815-023-02934-5>. <https://doi.org/10.1071/RD23168>
23. Shirazi A., Ardali M.A., Ahmadi E. et al. The effect of macromolecule source and type of media during in vitro maturation of sheep oocytes on subsequent embryo development. // *J. Reprod. Infertil.* 2012. Vol. 13. nr 1. P. 13-19.
24. Srirattana K., Kaneda M., Parnpai R. Strategies to Improve the Efficiency of Somatic Cell Nuclear Transfer. // *Int. J. Mol. Sci.* 2022. Vol. 23. nr 4. P. 1969. <https://doi.org/10.3390/ijms23041969>.
25. Sun M.Z., Liu Y.W., Cui M.S. et al. Intracellular strain evaluation-based oocyte enucleation and its application in robotic cloning. // *Engineering*. 2023. Vol. 24. P. 73-83. <https://doi.org/10.1016/j.eng.2022.04.016>.
26. Swegen A., Appeltan R., Williams S.A. Cloning in action: can embryo splitting, induced pluripotency and somatic cell nuclear transfer contribute to endangered species conservation? // *Biol. Reviews*. 2023. Vol. 98. nr 4. P. 1225-1249. doi: 10.1111/brv.12951
27. Tyagi S., Mani S. Media and buffer preparation for cell culture // In: *Animal cell culture: Principles and Practice. Techniques in Life Science and Biomedicine for the Non-Expert*. Springer, Cham. 2023. P. 77-88. https://doi.org/10.1007/978-3-031-19485-6_5
28. Wang L.J., Xiong X.R., Zhang X. et al. Defined media optimization for in vitro culture of bovine somatic cell nuclear transfer (SCNT) embryos. // *Theriogenology*. 2012. Vol. 78. nr 9. P. 2110-2119. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2012.03.011>
29. Van Langendonck A., Donnay I., Schuurbiens N. et al. Effects of supplementation with fetal calf serum on development of bovine embryos in synthetic oviduct fluid medium. // *J. Reprod. Fertil.* 1997. Vol. 109. nr 1. P. 87-93. doi: 10.1530/jrf.0.1090087
30. Wilmut I., Schnieke A.E., McWhir J. et al. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. // *Nature*. 1997. Vol. 385. nr. 6619. P. 810–813. <https://doi.org/10.1038/385810a0>.
31. Zander-Fox D.L., Pacella-Ince L., Morgan D.K., Green M.P. Mammalian embryo culture media: now and into the future. // *Reprod. Fertil. Dev.* 2023. Vol. 36. nr 2. P. 66-80. <https://doi.org/10.1071/RD23168>

References (for publications in Russian)

1. Lopukhov A.V., Shedova E.N., Tsyndrina E.V., Singina G.N. [The effect of cytochalasin B during cytoplasm preparation on the efficiency of somatic cloning in sheep (*Ovis Aries*)]. *Geny i kletki* (Genes&Cells). 2025. 20(1). 31-40. <https://doi.org/10.17816/gc638127>
2. Singina G.N., Lopukhov A.V., Shedova E.N. [In vitro development of cloned embryo in cattle in relation with fusion and activation parameters]. *Sel'skokhozyaistvennaya Biologiya* (Agricultural Biology). 2020. 55(2): 295-305. doi: 10.15389/agrobiology.2020.2.295eng
3. Singina G.N., Lukanina V.A., Shedova E.N. et al. The results of production and transplantation of IVEP embryos in sheep (*Ovis aries*). *Sel'skokhozyaistvennaya Biologiya* (Agricultural Biology). 2023. 58(6): 1088-1099. doi: 10.15389/agrobiology.2023.6.1088eng
4. Singina G.N., Lopukhov A.V., Shedova E.N., Zhukova A.N. The Influence of oocyte and donor cell preparation conditions on the efficiency of somatic cloning in sheep (*Ovis aries* L.). *Sel'skokhozyaistvennaya Biologiya* (Agricultural Biology). 2024. 59(4): 692-703. doi: 10.15389/agrobiology.2024.4.692eng

UDC 636.3: 576.5: 591.39

Effect of medium composition during oocyte enucleation and donor cell nuclear transfer on somatic cloning efficiency in sheep (*Ovis aries*)

Lopukhov A.V., Shedova E.N., Zhukova A.S., Singina G.N.

Federal Research Center of Animal Husbandry, Ernst Institute of Animal Husbandry, Podolsk-Dubrovitsy, Moscow oblast, Russian Federation

ABSTRACT. To improve the efficiency of somatic cloning, developing adequate conditions for each stage of somatic cell nuclear transfer technology is crucial. The aim of this study was to evaluate the effect of fetal bovine serum (FBS) and bovine serum albumin (BSA) in the oocyte enucleation and somatic cell nuclear transfer medium on the production of cloned ovine embryos. Oocyte-cumulus complexes obtained from ovine ovaries were cultured for 19-23 h in a maturation medium. After purification from cumulus cells, oocytes were selected based on the presence of the first polar body (FPB). Oocytes were enucleated by aspiration of the FPB and adjacent cytoplasm. Somatic cells (SCs) were injected into the FPB of the enucleated oocyte using a micropipette previously used for FPB biopsy. The NT procedure (enucleation and nuclear transfer) was performed in two versions of TC-199 medium: with 5% FBS and 0.3% BSA. The resulting oocyte/SC complexes were combined by electrofusion. Cytohybrids were activated with ionomycin, incubated with 6-dimethylaminopurine and cycloheximide, and cultured for 48 hours. The addition of BSA to the NT medium resulted in a decrease in the efficiency of oocyte and SC fusion from 39 to 24% ($P<0.001$) and cleavage of the resulting cytohybrids from 58 to 39% ($P<0.05$) compared to FBS. When micromanipulations lasted 40 minutes or less, an advantage of FBS over BSA in the NT medium was observed in terms of the parameters of formation ($P<0.05$) and cleavage of cytohybrids ($P<0.05$). When the NT procedure lasted over 40 minutes, there were no intergroup differences in the efficiency of fusion and embryonic development. Concluded that FBS is a preferred source of protein macromolecules at the NT stage of somatic cloning when the duration of this procedure is 40 minutes or less.

Keywords: sheep, somatic cloning, oocyte, somatic cell, fetal bovine serum, bovine serum albumin, fusion, embryonic development.

Problemy biologii produktivnykh zhivotnykh (Productive Animal Biology). 2025. 4: 84-92.

Поступило в редакцию: 24.11.2025

Получено после доработки: 21.12.2025

Сведения об авторах:

Лопухов Александр Викторович, н.с.; vubi_myaso@mail.ru

Шедова Екатерина Николаевна, н.с.; shedvek@yandex.ru

Жукова Анастасия Сергеевна, к.б.н., с.н.с.; anastasia.s.belyaeva@gmail.com

Сингина Галина Николаевна, к.б.н., рук. лаб.; g_singina@mail.ru