

Обзоры, проблемы

УДК 636.082:573.6.086.83

doi: 10.15389/agrobiology.2014.2.3rus

**СОМАТИЧЕСКОЕ КЛОНИРОВАНИЕ МЛЕКОПИТАЮЩИХ:
ДОСТИЖЕНИЯ, ВОЗМОЖНОСТИ, ПРЕПЯТСТВИЯ**
(обзор)

Г.Ю. КОСОВСКИЙ, Е.В. КОРНИЕНКО, В.И. ГЛАЗКО

Выполнен анализ результативности соматического клонирования у разных видов животных. Представлены данные о молекулярных механизмах и генетических событиях при клонировании и репрограммировании, о химерности клонов по митохондриальной ДНК и ее возможных последствиях при внутри- и межвидовом клонировании. Обсуждаются основные проблемы, связанные с методическими трудностями, низкой эффективностью метода, большими потерями материала на всех этапах эмбрионального, натального и постнатального развития. В настоящее время соматическое клонирование прежде всего рассматривается как возможность быстро и надежно зафиксировать в потомстве уникальные особенности особей, которые имеют хозяйственно ценное или любое другое значение и/или могут быть утрачены из-за рекомбинаций при обычном способе воспроизведения животных либо их исчезновении. Метод позволяет использовать любые сочетания селекционных и трансгенных технологий: направленное встраивание *in vitro*, клеточный отбор и перенос ядра. Наиболее важной сферой применения обсуждаемого подхода должно стать сельское хозяйство. Однако при неоспоримых выгодах, которые сулит клонирование при ядерном переносе, и растущем числе успешных клонирований и клонов млекопитающих коммерческое использование этого метода пока что ограничено чрезвычайно низкой эффективностью, высокой затратностью и большими потерями материала. К тому же молекулярные и клеточные механизмы событий, происходящих при соматическом клонировании, сложны, специфичны и требуют дальнейшего углубленного изучения. Все перечисленное вынуждает исследователей, во-первых, искать более эффективные альтернативные подходы, во-вторых, сосредоточить внимание на элементах методики, требующих совершенствования. Тем не менее, несмотря на все еще низкую эффективность (3-5 %) и меньшую распространенность метода по сравнению с прогнозами, клонированные животные постепенно становятся неотъемлемой частью сельского хозяйства в США и Европе. Технология соматического клонирования предоставляет большие возможности для фундаментальных исследований генетических процессов, функциональной активности генома, клеточной дифференцировки и пр. Широкие перспективы, открывающиеся благодаря внедрению методик клонирования в сельскохозяйственную практику и медицину, должны получить всестороннюю морально-этическую оценку, чтобы исключить спекулятивные настроения как у сторонников, так и у противников клонирования.

Ключевые слова: клон, соматическое клонирование, энуклеированные яйцеклетки, репрограммирование, тотипотентность, плюрипотентность, эмбриональные стволовые клетки.

В XX веке соматическое клонирование рассматривали в качестве подхода, обещающего общебиологический прорыв в решении многих задач в медицине (регенеративные технологии, замена поврежденных органов и тканей), в сельском хозяйстве (массовое получение высокопродуктивных животных), и даже как основу методов приобретения личного бессмертия. Большинство проектов по-прежнему нуждаются в дальнейших научных исследованиях, но в отдельных областях уже накоплены определенные успехи. Активно развивается новое направление, когда трансгенные животные сельскохозяйственных видов становятся идеальными «биореакторами» по производству фармакологически важных белков человека (1). Несмотря на то, что в роли биореактора крупный рогатый скот проигрывает по сравнению с козами и кроликами из-за длительного периода полового созревания и беременности, получение в этих целях трансгенных коров имеет очевидные преимущества вследствие несопоставимо больших, чем у других видов млекопитающих, общих удоев (6-8 тыс. л за лактацию).

Рекомбинантные белки, необходимые для лечения человека и животных, к настоящему времени получают в основном с использованием

генетически модифицированных клеточных популяций млекопитающих (2). Однако такой подход существенно дороже, чем использование животных сельскохозяйственных видов (в 10-100 раз в расчете на 1 кг целевого продукта) (1). Важное значение приобретает необходимость разработки простых и дешевых приемов создания подобных биореакторов в связи с проблемами иммунотерапии некоторых онкологических заболеваний человека (3), инфекционных заболеваний у сельскохозяйственных животных (4). С учетом огромной потребности в рекомбинантных белках в медицине и ветеринарии интенсификация этих исследований требует особого внимания.

В этой области к настоящему времени сложились и развиваются два направления — получение трансгенной спермы с ее последующей трансплантацией в семенники облученных животных (5) и трансплантация ядер из генетически модифицированных клеточных популяций в энуклеированные яйцеклетки. Каждый из этих методов пока что имеет ряд недостатков и требует усовершенствований, чем обусловлена необходимость дальнейших исследований.

Опыты по клонированию млекопитающих при помощи пересадки ядер соматических клеток (somatic cell nuclear transfer — SCNT) с использованием энуклеированных ооцитов в качестве цитопластов начались в середине 1970-х годов на мышах как модельном объекте. Инициировали их постановку эксперименты с химерами (6-8). Первые пересадки показали, что у млекопитающих в отличие от земноводных потеря тотипотентности происходит на очень ранних стадиях: у мышей — 8 клеток (9, 10), у овец (11) и коров (12) — примерно 16 или 32 клеток (13). Несмотря на все еще низкую эффективность метода (3-5 %) и его ограниченную (по сравнению с прогнозами) распространенность (14), клонированные животные постепенно становятся неотъемлемой частью сельского хозяйства в США (15) и Европе (16).

Значительным достижением в клонировании млекопитающих считается получение клона овец (пяти идентичных животных), при котором донорами ядер были клетки линии TNT4 из 9-суточного зародыша овцы (17). Из пяти родившихся ягнят двое погибли вскоре после рождения, третий — на 10-е сут, двое оставшихся достигли 8-9-месячного возраста. Анализ микросателлитных маркеров подтвердил происхождение всех особей от клеточной линии TNT4. Затем было опубликовано знаменитое сообщение I. Wilmut с соавт. о рождении овцы Долли (18). Работа методически во многом повторяла предыдущее исследование, однако в ней использовали три типа клеточных культур — эмбриональные клетки, фибробластоподобные клетки плода и клетки молочной железы от 6-летней овцы породы Finn Dorset, находящейся на последнем триместре беременности. Все три типа клеточных культур имели нормальный кариотип овцы ($n = 54$). Клетки — доноры ядер пассировали в культуре, деление останавливали на стадии G_0 и ядра клеток пересаживали, используя электрослияние, в энуклеированные ооциты на стадии метафазы II. В варианте с культурой клеток молочной железы в качестве донора ядер выход морул/бластоцист был примерно в 3 раза меньше, выход живых ягнят от числа пересаженных в матку окончательного реципиента морул/бластоцист — в 2 раза ниже. Всего в этой серии из 277 реконструированных яйцеклеток получили одного живого ягненка, что указывает на очень низкую результативность (0,36 %). Микросателлитный анализ ДНК у семи родившихся живыми ягнят подтвердил, что все три использованных типа клеточных культур способны быть донорами ядер при клонировании. Из реконструированной яйцеклетки с ядром от культивируемой клетки молочной железы была получе-

на овца по кличке Долли, которая фенотипически не отличалась от овцы-донора ядра.

Успех авторов этой работы прежде всего связан с использованием относительно длительного культивирования клеток: в результате многих пассажей (от 3-6 до 7-9) могли быть отобраны малодифференцированные стволовые клетки, ставшие донорами ядер. Большое значение имел, по-видимому, и тот факт, что авторы синхронизировали стадии клеточного цикла энуклеированных ооцитов-реципиентов и клеток-доноров. Предварительно они установили, что лучше пересаживать ядра донорских клеток, находящихся на стадии G₁, в энуклеированные ооциты на стадии метафазы II, поскольку слияние цитопласта с кариопластом, индуцируемое электрическим импульсом, активирует дробление энуклеированного ооцита (19).

В связи с возможными последствиями использования ядер соматических клеток взрослого организма возник вопрос о длине теломерных участков и экспрессии теломеразы у клонов. Укорачивание теломер, представляющих собой длинные гексануклеотидные повторы (TTAGGG)_n на концах хромосом млекопитающих, происходит при репликации ДНК и служит одной из структурных характеристик ДНК, меняющихся в большинстве делящихся *in vivo* и *in vitro* клетках. Теломеры играют важную роль в обеспечении стабильности, репликации и сегрегации хромосом в митозе. Систематические потери теломерных последовательностей, составляющие 50-200 п.н. на каждое деление, могут приводить к «митотической катастрофе» (20). Достигая критической длины, теломера утрачивает способность связываться со специальным белковым комплексом, защищающим концы линейных хромосом от межхромосомных слияний, что приводит к разрушению генетического аппарата клетки. Однако клетки способны синтезировать копии TTAGGG-последовательности *de novo* благодаря работе фермента теломеразы, обладающей активностью РНК-зависимой ДНК-полимеразы. Теломераза экспрессируется в быстро пролиферирующих клетках (эмбриональные и некоторые генеративные), ее активность существенно увеличивается в индуцированных плюрипотентных клетках, однако не обнаруживается в большинстве соматических клеток (21).

Определение средней длины теломерного повтора у овцы Долли (перенос ядра соматической клетки от 6-летней овцы), и двух других (трансплантация ядер из клеток 9-суточного эмбриона и фибробластов 25-суточного плода) показало (22), что у всех клонированных особей она была меньше, чем у контрольных животных того же возраста (у Долли в возрасте 1 года — на 20 % короче, оставаясь, однако, несколько больше, чем в клетках молочной железы 6-летней овцы). Предполагается, что такая длина повторов у Долли обусловлена не только физиологическим возрастом животного-донора, но и продолжительностью культивирования донорских клеток *in vitro*. Показано, что состав культуральных сред также влияет на длину теломер: клеточные пассажи в обедненной среде снижают теломеразную активность на 30-50 % (23). Укорочение теломер наблюдалось при культивировании *in vitro* в клетках эмбриональных фибробластов крупного рогатого скота и в стволовых эмбриональных клетках на поздних этапах пассирования (24).

Большинство аномалий у клонируемых эмбрионов обусловлены ускоренным ростом плода и плаценты, получившим название синдрома крупных потомков (*large offspring syndrome* — LOS) (25). Предполагается, что он может быть связан с изменением эпигенетической регуляции импринтируемых генов при репрограммировании ядра соматической клетки в энуклеированном эмбрионе. Действительно, у гибридных эмбрионов,

полученных от скрещиваний *Bos indicus* и *B. taurus* (что позволяло дифференцировать аллели по межвидовым различиям по SNP — single nucleotide polymorphism), после SCNT обнаруживается гипометилирование генов — мишеней импринтинга, и их экспрессия по обоим аллелям, что наглядно подтверждает гипотезу о нарушении репрограммирования генетического аппарата соматических ядер при трансплантации в энуклеированный ооцит (26). При сравнительном анализе профилей генной экспрессии у эмбрионов, полученных методом SCNT и при оплодотворении ооцитов *in vitro*, обнаружены множественные отличия по генам, продукты которых участвуют в клеточной адгезии, внутриклеточном транспорте, протеолизе, контроле клеточного цикла. В частности, изменена экспрессия импринтируемых генов, ассоциация которых с контролем клеточной пролиферации и плацентомегалией выявлены у человека. Наблюдаемые изменения, как полагают, лежат в основе формирования различных патологий развития у клонируемых эмбрионов (25). При получении эмбрионов методом SCNT наблюдается медленная замена формы линкерного гистона H1 хроматина соматических клеток на эмбриональную, что также связывают с нарушением репрограммирования при такой трансплантации ядер, в частности у крупного рогатого скота (27).

В качестве маркера репрограммирования (дефект рисунка метилирования) рассматривали метилирование CpG сайтов в α -сателлите (asatI-5) крупного рогатого скота в процессе развития эмбрионов, полученных в результате искусственного осеменения (AI), оплодотворения *in vitro* (IVF) и методом SCNT. В клетка-донорах и бластоцистах, полученных методом SCNT, метилирование по asatI-5 было существенно выше, чем в бластоцистах после IVF. При имплантации не наблюдали различий по метилированию asatI-5 в тканях трофобласта между вариантами SCNT и AI, однако сами эмбрионы, полученные при SCNT, были гиперметилированными по сравнению с контролем (AI) в этот период развития. После имплантации ДНК-метилирование по asatI-5 уменьшалось в тканях плаценты у эмбрионов при AI, но не у полученных методом SCNT. В отличие от плаценты, доля метилированных сайтов по asatI-5 оставалась высокой в тканях надпочечников, почек и в мышечной ткани в процессе развития эмбрионов. У эмбрионов, полученных разными методами, в среднем различия по степени метилирования между тканями были меньше, чем между плацентами, однако сохранялось сравнительно избыточное метилирование в соматических тканях эмбрионов, полученных с помощью SCNT. Авторы полагают, что повышенный уровень метилирования в бластоцистах в варианте с SCNT и в последующем в соматических тканях этих эмбрионов может быть обусловлен либо тем, что соответствующие изменения еще не успели произойти, либо отсутствием такого количества специфических факторов в цитопластах ооцитов, которое необходимо для полноценного репрограммирования хроматина соматических клеток (28). Дефекты репрограммирования генетического аппарата рассматривают в качестве основной причины низкой эффективности клонирования посредством трансплантации ядер соматических клеток в энуклеированные яйцеклетки (28).

Предполагается, что подбор более щадящих методов получения энуклеированных ооцитов (29), их криоконсервации (30), систем культивирования эмбрионов при SCNT (31) может способствовать уменьшению дефектов развития и повышению эффективности метода SCNT при получении полноценных животных сельскохозяйственных видов (в частности, крупного рогатого скота) (32).

Следует отметить, что фетальные фибробласты, используемые в

подобных экспериментах, обычно претерпевают при культивировании около 30 делений, что ограничивает возможности их генетической модификации. Для преодоления проблем клеточного старения применяли повторное клонирование: эмбрионы, развившиеся после переноса измененных ядер, в свою очередь, использовались для получения второго поколения фетальных трансформированных фибробластов в культуре (32). Эти фетальные клетки тоже могли претерпевать 30 клеточных делений в культуре и подвергаться второй генетической модификации.

Успеху генетических модификаций способствовала разработка методов гомологичной рекомбинации (homologous recombination — HR, или адресная инсерция генов — gene-targeting, впервые осуществлена в середине 1980-х годов). С использованием эмбриональных стволовых клеточных линий (ES) и HR были созданы более 800 линий лабораторных мышей с наследуемыми изменениями, включая особей с «выбитыми» (knock-outs) и «вставленными» (knock-ins) генами и тонкими генными мутациями. Такие мыши служат моделями в исследованиях болезней человека и проблем иммунологии, генетики развития, онкогенетики, структурно-функциональной организации определенных генов. После появления овцы Долли стало понятно, что имеющееся ограничение на получение ES клеток у домашних животных может быть снято посредством соматического клонирования и домашние животные могут использоваться в тех же исследованиях, что и линии лабораторных мышей.

Получены данные о преодолении ограничения жизни первичных культур клеток домашних животных и успехе адресной инсерции (вставки) гена в определенный геномный участок с помощью гомологичной рекомбинации в первичных культурах клеток овец и свиней (33). Сначала селективный маркерный ген адресовали посредством инсерции в определенный локус в фибробластах овцы, затем трансген, несущий α -1-антитрипсин под контролем промотора гена β -лактоглобулина овцы был встроен в комбинации с маркерным геном в тот же локус. Частота рекомбинаций оказалась очень высока: 66 % клеточных клонов содержали инсерцию трансгена. В результате получили двух живых ягнят (Cupid и Diana), которые были первыми клонированными овцами с адресованным трансгеном. Авторы добились успеха и при направленном повреждении гена α -1,3-галактозилтрансферазы в соматических клетках свиньи с использованием гомологичной рекомбинации. Такие клетки могут использоваться при трансплантации ядер с целью получения особей, клетки которых лишены остатков сахара Gal- α -1,3-Gal, что связано с возможностью преодоления гиперострого отторжения ксеногенных трансплантатов тканей.

Достигнуты успехи в использовании адресных модификаций для повышения продукции трансгенных белков. Ряд компаний разработали и применяют методики по получению терапевтически важных для человека белков, секретируемых в молоко коров, овец, коз, кроликов (1).

В последние годы появились новые методы «редактирования» генома (вариантов адресного мутагенеза). В этих целях используют, например, сайт-специфичные домены белков — активаторов транскрипции, объединенные с нуклеазами, связывающихся с определенными участками ДНК (34).

Наиболее важными факторами, определяющими успешность клонирования, в настоящее время считают тип клеток-доноров и происхождение ткани, синхронизацию стадии клеточного цикла клеток-доноров, степень дифференцировки, условия культивирования, способность к пролиферации, хромосомную стабильность и эпигенетический статус клеток-

доноров (35). Однако вопрос о точном влиянии всего этого, а также типе клеток, наиболее подходящем для трансплантации ядер, остается не выясненным (36). Из-за противоречивости данных пока нельзя с очевидностью утверждать, что возраст донора и длительность культивирования клеток *in vitro* сказываются на их компетентности. Возможно, такая неоднозначность обусловлена тем, что в исследованиях по клонированию применяют разные типы клеток, протоколы их приготовления, способы ядерного переноса и активации, культуральные системы.

В дифференцировку трансплантированного ядра в энуклеированном ооците вовлечены линкерные гистоны, поликомбинированные группы протеинов, CpG-связанные протеины и другие агенты, осуществляющие специализированную репрессию хроматина (37). Репрограммирование трансплантированного ядра, как полагают, связано с метилированием и деметилированием ДНК, регулирующим генную экспрессию (38), и координирующие изменения в организации хроматина, происходящие после ядерного переноса во время первых клеточных делений, необходимы для успешного клонирования (39).

Помимо решения биотехнологических задач, соматическое клонирование позволяет подбирать интересные сочетания ядерного и митохондриального генотипов, поскольку в результате его использования получают химерные организмы. У овцы Долли, клонированной с использованием линии соматических клеток, и у девяти овец, полученных при ядерном переносе от зародышевых клеток, митохондриальная ДНК принадлежала почти исключительно реципиентным энуклеированным ооцитам с некоторым вкладом от соответствующих донорских клеток. Таким образом, будучи настоящими ядерными клонами, эти особи все-таки представляли собой генетические химеры с ядерной ДНК клетки-донора и митохондриальной ДНК реципиентных ооцитов (40). В реконструированном эмбрионе митохондриальная ДНК клетки-донора достаточно быстро исчезает (частично или полностью) уже на ранних стадиях эмбриогенеза (41).

Внутривидовое скрещивание с использованием методов клонирования может быть способом подбора интересных комбинаций наследственного ядерного и митохондриального материала для создания новых пород у домашних животных (42). Такого рода комбинирование возможно и на межвидовом уровне. В частности, показано (43), что цитопласт метафазного ооцита коровы при пересадке донорских ядер от животных разных видов в состоянии обеспечивать нормальную клеточную пролиферацию ооцита (во всяком случае до стадии бластоцисты). У млекопитающих механизмы, регулирующие ранний эмбриогенез, консервативны, и цитопласт коровы в состоянии обеспечивать пролиферацию инкорпорированного дифференцированного ядра с набором хромосом донорской клетки.

Однако при переносе ядер соматических клеток гяура в энуклеированные ооциты крупного рогатого скота было обнаружено, что распределение митохондрий клеток — доноров ядер у эмбрионов варьирует, что может сказываться на их выживаемости и, вероятно, зависит от митохондриона как яйцеклеток, полученных от разных коров, так и клеток-доноров, то есть от внутривидовой изменчивости митохондриона. Предполагается, что генетическая гетерогенность митохондриальных клонов и взаимодействия между ними могут влиять на выживаемость межвидовых эмбрионов, получаемых методом SCNT (44).

У крупного рогатого скота клонирование на основе трансплантации диплоидных ядер соматических клеток в энуклеированную яйцеклетку, несмотря на большую сложность, остается актуальным и перспектив-

ным направлением биотехнологии. Наряду с возможностью сохранения ценных генотипов и ускорения селекции, немаловажно то, что отпадает необходимость проверки эмбрионов по полу.

Интенсивные работы по клонированию крупного рогатого скота начались в 1980-х годах. В это время в США была даже создана аграрная компания «Granada», специализировавшаяся на клонировании быстро растущих коров, однако из-за убытков вследствие того, что не удалось преодолеть синдром крупноплодия — LOS, она вскоре прекратила деятельность. Несмотря на низкую эффективность метода, с тех пор число клонированных коров растет.

Генетические манипуляции со стволовыми зародышевыми клетками революционизировали генетические исследования. Так, на мышах использование стволовых эмбриональных клеток (ES) на поздних пассажах клеточной линии R1 позволило получить жизнеспособное потомство (45). Причем *in vitro* 29 % реконструированных ооцитов достигли стадии бластулы/морулы, а из 8 % от суррогатных матерей были получены новорожденные. Уже на стадии клеточного цикла G₁-G₂ ядра ES клеток оказались способными обеспечить развитие реконструированной клетки. У млекопитающих сельскохозяйственных видов получение эмбриональных стволовых клеточных линий, доступных для генно-инженерных манипуляций в культуре, крайне затруднено, вследствие чего альтернативным подходом служит технология переноса (клонирования) ядер из культивируемых клеток взрослого организма в яйцеклетки. Например, у коров число клонов, полученных с его помощью, составляет свыше 300 гол. Более успешно и распространено клонирование с использованием ядер клеток женской репродуктивной системы: эпителиальных клеток молочной железы, кумулюсных клеток, эпителия яйцеводов (46).

Наряду с расширением спектра клеток-доноров, используемых в SCNT крупного рогатого скота, изучают способность ядер клеток от животных разных возрастных категорий обеспечивать полное репрограммирование. Одно из условий ядерного репрограммирования — удаление модификаций, которым подвергся хроматин при дифференцировке и делении клетки. Ооциты млекопитающих могут восстанавливать эти изменения до состояния тотипотентности, что позволяет получать жизнеспособное потомство из ядер соматических клеток. Неполное генетическое репрограммирование генной экспрессии, связанное с частичным восстановлением структуры хроматина, приводит к нарушениям и аномалиям, наблюдаемым у клонированных эмбрионов, зародышей, новорожденных.

Жизнеспособные клоны с полным репрограммированием ядер получили с использованием фибробластов, эмбриональных клеток, клеток взрослых животных (47-50). Доля успешно клонированных особей в варианте с клетками-донорами от взрослых животных (14 %) оказалась близкой к описанной для фетальных клеток (15 %) (47) и фолликулярных клеток (10 %) (49). В экспериментах Y. Kato с соавт. (49) родились восемь телочек (четыре умерли почти сразу после рождения вследствие пневмонии, асфиксии от избытка амниотической жидкости, задержки родов). При этом доля реконструированных яйцеклеток, которые развились до бластоцист, для кумулюсных клеток составила 49 %, для клеток яйцеводов — 23 %. Эти значения выше, чем для бластоцист, которые получали ранее при трансплантации ядер из фетальных фибробластов в энуклеированные яйцеклетки (12 %). Возможно, клетки кумулюса обеспечивают максимальную совместимость ядра с цитоплазмой в образованной конструкции: их отростки способны проникать через зону пеллюцида и контактировать с ци-

топлазмой ооцита, что обеспечивает перенос молекул между ними и ооцитом. Как следствие, цитоплазматическое содержимое у клеток кумулюса и ооцитов может быть наиболее сходным, чем и объясняется повышение эффективности трансплантации при переносе кумулюсных ядер в энуклеированные зиготы.

Описано влияние продолжительности культивирования *in vitro* на эффективность клонирования. Так, клон (6 телят) получен из фибробластов (ткань уха) 17-летнего быка японской черной мясной породы после их длительного (3 мес) культивирования *in vitro* до переноса ядер (50). Физиологическое состояние и число пассажей в культуре в значительной степени влияли на успешность клонирования (скорость развития эмбрионов в варианте с клетками-донорами после 10-15 пассажей была выше, чем после 5 пассажей). Как и в случае SCNT у овец, предварительное голодание клеток стало важным условием успешной трансплантации ядер. Авторы этой работы предположили, что уменьшение эффективности клонирования при использовании клеток 5-го пассажа связано с тем, что в этом пассаже в культуре, кроме фибробластов, еще присутствуют другие типы клеток, например эпителиальные клетки, непригодные для клонирования, которые впоследствии вытесняются фибробластами. Как и в более ранних экспериментах, продолжительность беременности и масса при рождении у клонированных телят оказались выше (соответственно на 9 сут и 20 %), чем в среднем по породе (50).

Согласно этим данным, фибробласты взрослых животных могут длительно поддерживаться в культуре без утраты способности формировать клоны при ядерной трансплантации (3 мес, или 15 пассажей и 45 клеточных удвоений). Такой период достаточен для направленной генетической модификации и дальнейшей селекции клеток. В то же время в работе D.S. Tsarali с соавт. (51) показано, что ядра от первично культивируемых клеток взрослого животного репрограммировались успешнее, тогда как материал, взятый из перевиваемых клеточных линий, оказался не в состоянии обеспечить развитие эмбрионов. В этой же работе наличие строгой обратной зависимости между возрастом *in vivo* и пролиферативной способностью *in vitro* показано пока только для фибробластов человека, полученных от донора старше 100 лет.

После удачно клонированных мышей, овец и коров появились трансгенные козы, полученные трансплантацией ядер из трансгенных клеток плода по протоколу, разработанному для овец (35). Эмбрионы, от которых выделяли клеточные линии, получали при скрещивании нетрансгенной самки с самцом, трансгенным по гену антитромбина (АТ) III человека, определяющему высокий уровень экспрессии АТ человека в молоке у лактирующих самок. Фетальные соматические клеточные линии из 35-40-суточных эмбрионов подвергали старению в условиях голодания. Трансплантация ядер этих клеток в энуклеированные ооциты привела к рождению трех козлят на 230 реконструированных эмбрионов (1,3 %), которые оказались самками. У одной из них гормонально индуцировали лактацию и в молоке обнаружили секрецию белка человека (3,7-5,8 г/л), что сопоставимо с экспрессией АТ у генно-модифицированных овец при естественном скрещивании (52).

Несмотря на интенсивные исследования, предельное значение эффективности (около 2 %) пока остается одной из проблем при SCNT у коз.

В течение последних 15 лет в мире получены клоны разных видов животных: свиней (53), коров (54, 55), собак (56), кошек (57), мышей (58), крыс (59), кроликов (60), лошадей (61), мулов (62), верблюдов (63), коз

(64), оленей (65) и рыб (66), и все это время неизменно поднимаются вопросы морального, этического, медицинского и законодательного характера, связанные с применением метода (67). Перенос ядер соматических клеток (SCNT) с генетической точки зрения не приводит к появлению истинных клонов как донора яйцеклеток (у клона отсутствует ядерная ДНК такой особи), так и донора ядерного материала (в большинстве случаев основная часть митохондриальной ДНК клона принадлежит цитопласту) (68).

Эффективность метода SCNT варьирует от 0,1-3,0 % (у мышей) (69) до 4,0-8,0 % (у крупного рогатого скота) (70, 71). Низкая эффективность клонирования с использованием соматических клеток, как правило, связана с большими потерями в первой половине беременности. Хотя уменьшение потерь во время беременности и высокий процент выживших клонов отмечали ранее при использовании ядер клеток эпителия яйцевода (24, 32), эти положительные достижения нивелировались высокой смертностью новорожденных (50 %).

Соматический перенос ядра у животных сопряжен с вероятностью появления нежелательных осложнений постэмбрионального развития, связанной с тем, что клетки взрослых организмов, используемые в качестве донорских, сами по себе могут иметь мутации. Клоны, полученные от таких клеток, чаще abortируются на поздних стадиях беременности, а у телят, родившихся в срок, чаще встречались аномалии по сравнению с клонами, произошедшими из зародышевых или фетальных клеток (50, 72). Помимо этого, наблюдалась высокая смертность клонированных телят в первые месяцы жизни (73, 74). Описаны также случаи отдаленных эффектов при соматическом клонировании. Так, теленок, у которого источником ядерной ДНК были клетки эмбриона, погиб на 51-е сут после рождения от тяжелой анемии, вызванной тимической атрофией и лимфоидной гипоплазией (75).

Для выяснения возможных причин высокой смертности среди клонированных телят в период внутриутробного развития и после рождения изучили экспрессию трех важных в метаболическом отношении ферментов — лактатдегидрогеназы, цитратсинтетазы и фосфофруктокиназы, но отклонений от нормы не выявили (76). В работе других авторов (77) в большинстве смертных случаев доказано наличие плацентарных аномалий на протяжении 1-3-го триместра внутриутробного развития у клонированных бычьих зародышей, полученных при переносе ядер соматических клеток в энуклеированные ооциты. Авторы полагают, что причинами этих аномалий могут быть особенности васкулярного и плацентарного роста, что повлияло на прикрепление плода и способность плаценты обеспечивать его жизнеспособность. Было также показано (78), что условия культивирования донорских клеток *in vitro* в дальнейшем существенно влияют на развитие органов и тканей. В работе использовали 6-суточные овечьи зиготы, которые извлекали и поддерживали в комбинированных культурах. У 23 % зародышей, полученных при сокультивировании с гранулезными клетками, наблюдали полигидрамниоз (увеличение объема амниотической жидкости), однако подобный эффект не отмечали при культивировании тех же клеток в синтетических жидких средах с различными добавками. У мышей, амфибий и коров при использовании эмбрионов, полученных посредством переноса соматических ядер, для создания последующих поколений животных-клонов потомство оказалось жизнеспособным после 3-5 раундов клонирования. Более высокие фетальные потери и уменьшение числа беременностей отмечали у особей из 2-го и 3-го поко-

лений клонированных животных (79).

Тем не менее, несмотря на отсутствие существенного увеличения эффективности соматического клонирования и то, что часть популяции клонированных эмбрионов заведомо несет ряд нарушений, клоны могут успешно развиваться после трансплантации реципиентам и приводить к рождению относительно здорового потомства. Следует также учитывать, что при клонировании перенос ядер из взрослой соматической клетки может вызывать некоторые отклонения от нормы, не носящие, однако, серьезного характера. Так, у мышей, полученных посредством переноса ядер кумулюсных клеток, постнатальная масса оказалась значительно выше, чем у контрольных животных, а результаты тестирования на поведенческие характеристики оказались близкими у особей обеих групп (80).

Разработан ряд подходов, которые, возможно, позволят повысить эффективность соматического клонирования. Один из них заключается в выборе оптимального метода энуклеации ооцита. К наиболее простым следует отнести «слепую» энуклеацию, которую применяют при клонировании кроликов, овец, коз, крупного рогатого скота, свиней и лошадей (81). Определение точного времени выделения первого полярного тельца у ооцитов, культивируемых *in vitro* (16-18 ч после начала созревания), и удаление зона *pellucida* позволили снизить объем аспирируемой ооплазмы до 3 % от общего объема ооцита и повысить эффективность энуклеации до 97 % (82), однако такие эмбрионы требуют индивидуальной системы культивирования. Несомненное преимущество описанного метода в том, что цитопласт не подвергается дополнительным воздействиям, которые могут в дальнейшем привести к нарушениям эмбрионального развития. Другой широко известный метод предполагает окрашивание красителем Hoechst и УФ-облучение. Процент успешных энуклеаций при этом выше, но уже при 30 с экспозиции повреждается цитоплазматическая мембрана клетки и нарушается синтез белков (55, 83). Применяют и такие методы энуклеации, как прокол зона *pellucida* и удаление выступающей части ооцита с полярным тельцем (81), использование флуорохромов для окраски ДНК со спектром поглощения, смещенным в более длинноволновую область (например, SYBR14) (81), энуклеация со вспомогательными химическими веществами (например, демиколцином) (84) и при помощи центрифугирования (81).

Еще один подход к повышению эффективности процедуры клонирования предполагает более тщательный отбор эмбрионов с наивысшим потенциалом развития на этапе, предшествующем трансплантации. Например, в настоящее время к наиболее эффективным системам отбора качественных эмбрионов у крупного рогатого скота относится предложенная S. Sugimura с соавт. (85). Она включает использование прижизненной съемки в реальном времени (*time-lapse*), устройства для индивидуального культивирования в микролунках и анализа потребления кислорода эмбрионами. Отбор эмбрионов по пяти показателям, включая время I деления, число бластомеров в конце I деления, наличие или отсутствие фрагментации в конце I деления, число бластомеров G₄-G₅ (начало фазы покоя), потребление кислорода на стадии бластоцисты, позволил получить высокий процент беременностей (78,9 %) после трансплантации. У родившихся телят не наблюдали увеличения массы тела, характерного для животных, полученных при помощи SCNT, и высокой смертности в начальный период жизни. Предложенная система отбора, несмотря на сложность, может стать одним из самых объективных и надежных при отборе культивируемых *in vitro* эмбрионов для трансплантации.

На стадии бластоцисты клонированные эмбрионы млекопитающих содержат меньшее число клеток, чем развивающиеся *in vivo* (86). При этом общее число клеток в бластоцистах при SCNT сравнимо с таковым у полученных без трансплантации ядер, но отношение числа клеток из внутренней клеточной массы к их общему числу у бластоцист при SCNT значительно выше (86). Число клеток в бластоцисте млекопитающих, культивируемой *in vitro*, можно увеличить за счет агрегация бластомеров из ранних эмбрионов (87). Так, при SCNT агрегация нескольких мышиных эмбрионов на ранних стадиях развития приводила к 8-кратному увеличению показателей развития после трансплантации (87), на стадии 4 бластомеров — еще и к увеличению экспрессии мРНК гена Pou5f1 (маркер недифференцированных клеток) и белка Cdx2, необходимого для формирования плаценты (87, 88). Однако при этом для создания одного клона требуется большое количество биологического материала.

Качество используемых ооцитов также отражается на эффективности SCNT, поэтому их созревание *in vitro* — важный этап получения эмбрионов. Модификация среды для созревания, в том числе добавление антиоксидантов и витаминов (например, витамина E), приводит к увеличению числа формирующихся бластоцист и уменьшению фрагментации ДНК в клонированных эмбрионах, полученных при использовании ядер трансгенных доноров (89). Эффективной стратегией улучшения качества эмбрионов при SCNT может стать использование ооцитов, полученных при помощи метода «выщипывания» ооцитов (*ovum pick-up*) (90), созревших *in vivo* (91) или обработанных препаратами, блокирующими мейоз (92).

Перспективным для увеличения эффективности клонирования млекопитающих представляется поиск биомаркеров состояния получаемых особей. В качестве таких биомаркеров наиболее часто рассматривают активность теломеразы и длину теломеров, эпигенетические модификации, экспрессию генов и белков (68). Но малые и нерепрезентативные выборки в большинстве таких исследований, а также то, что для сравнения клонированных и обычных животных используются различные ткани и культуры клеток, приводят к тому, что результаты исследований часто противоречат друг другу и не позволяют установить определенные параметры оценки (68). Также неоднозначны данные о положительном влиянии обработки эпигенетическими модификаторами на развитие эмбрионов крупного рогатого скота при SCNT (93, 94).

Подводя итог, отметим, что с помощью клонирования посредством ядерного переноса у сельскохозяйственных животных можно реплицировать большое число особей с преимущественными комбинациями генов, используя одновременно любые сочетания селекционных методов и трансгенных технологий: направленное встраивание *in vitro*, клеточный отбор и перенос ядра. Без клонирования созданные трансгенным способом уникальные сочетания генов легко утрачиваются из-за рекомбинаций. Поэтому очевидно, что наиболее важной сферой применения этого метода должно стать сельское хозяйство. При всех неоспоримых выгодах, которые сулит клонирование при ядерном переносе, чрезвычайно низкая эффективность и большие потери на всех этапах эмбрионального, нательного и постнатального развития пока что ограничивают возможности коммерческого использования этого метода в сельском хозяйстве, что вынуждает исследователей, во-первых, искать более эффективные альтернативные подходы, во-вторых, сосредоточить внимание на элементах методики, требующих совершенствования.

Еще одной областью применения соматического клонирования мо-

жет быть ДНК-археология (реконструирование вымерших видов или особей из несколько клеток животных) и сохранение биоразнообразия в связи с проблемой исчезающих видов. Для этого уже в настоящее время необходимо сформировать и поддерживать банки тканей животных, которым угрожает исчезновение.

Репродуктивное клонирование человека хотя и обсуждается, но остается (причем не только по этическим соображениям) опасным и соответственно полностью непригодным способом увеличения населения, на что указывают множественные отклонения от нормы и мертворождения, сопутствующие репродуктивному клонированию у животных. В то же время клонирование предоставляет на редкость уникальные возможности (получение терапевтических белков, ксенотрансплантация органов от клонированных трансгенных животных с заданными качествами) для борьбы с заболеваниями человека, а также в случаях искусственного оплодотворения *in vitro* для преодоления бесплодия, продления возраста материнства или с целью исключения генетических заболеваний, связанных с митохондриальной ДНК.

Итак, в настоящее время соматическое клонирование прежде всего рассматривается как возможность быстро и надежно зафиксировать в потомстве уникальные особенности животных, которые имеют хозяйственно ценное или любое другое значение и/или могут быть утрачены при обычном способе воспроизведения животных либо их исчезновении. Эта технология предоставляет большие возможности для фундаментальных исследований генетических процессов, функциональной активности генома, клеточной дифференцировки и пр. В то же время молекулярные и клеточные механизмы событий, происходящих при соматическом клонировании, сложны, специфичны, требуют дальнейшего углубленного изучения, а сама технология все еще имеет низкую эффективность и высокочематратна, хотя число успешных клонирований и полученных клонов млекопитающих растет. Широкие перспективы, открывающиеся благодаря внедрению методик клонирования в сельскохозяйственную практику и медицину, должны быть, тем не менее, всесторонне оценены с морально-этической точки зрения, поскольку отсутствие такой экспертизы может сделать возможным появление спекулятивных настроений как у сторонников, так и у противников клонирования.

*ГНУ Центр экспериментальной эмбриологии
и репродуктивных биотехнологий,
127422 Россия, г. Москва, ул. Костякова, 12, стр. 4,
e-mail: vglazko@yahii.com*

*Поступила в редакцию
31 января 2014 года*

Sel'skokhozyaistvennaya biologiya [Agricultural Biology], 2014, № 2, pp. 3-19

ASPECTS OF SOMATIC CLONING IN MAMMALIAN SPECIES: ACHIEVEMENTS, OPPORTUNITIES, AND OBSTACLES (review)

G.Yu. Kosovsky, E.V. Kornienko, V.I. Glazko

*Center for Experimental Embryology and Reproductive Biotechnology, str. 4, 12, ul. Kostyakova, Moscow, 127422 Russia,
e-mail vglazko@yahii.com*

Received January 31, 2014

doi: 10.15389/agrobiolgy.2014.2.3eng

Abstract

The analysis on a somatic cloning productivity in different animal species is submitted. The data are summarized on molecular and genetic events involved in cloning and cell reprogramming, chimerism on mitochondrial DNA under intra- and interspecific cloning. The essential problems connected with methodical difficulties, low efficiency, and big losses during embryonic, pre- and postnatal development are in the focus. The somatic cloning is now mainly considered as an opportunity for rapid and durable fixation of the unique valuable traits of an individual, which can be lost

due to recombination under normal reproduction or resulting from the threat of extinction. The method allows to combine different breeding and transgenic technologies, i.e. the targeted in vitro insertions, cell selection, and cell nuclear transfer. An agriculture is considered as the main area in which this approach should be used. But, despite of expected advantages and the increased number of successful cloning and clones, reported all over the world, a commercial use of the method in animal husbandry is strictly limited by the extremely low efficacy, high costs, and big losses of the initial material. At the same time, the specific molecular and cell mechanisms, involved in somatic cloning, should be further studied. That is why the more effective alternative approaches are forced to be sought, and the cloning technique must be improved. Nevertheless, despite the still low efficiency (3-5 %) and a lower use compared with forecasts, the cloned animals gradually become an integral part of agriculture in the U.S. and Europe. Somatic cloning is also prospective for fundamental genetics, particularly in studying genome expression, cell differentiation, etc. The ethic aspects of cloning in agriculture and medicine must be also discussed and estimated to prevent speculations both of opponents and supporters of the method.

Keywords: clone, somatic cloning, enucleated oocyte, reprogramming, totipotency, pluripotency, embryonic stem cells.

REFERENCES

1. Wang Y., Zhao S., Bai L., Fan J., Liu E. Expression systems and species used for transgenic animal bioreactors. *BioMed Res. Int.*, 2013, ID 580463 (<http://dx.doi.org/10.1155/2013/580463>).
2. Maksimenko O.G., Deykin A.V., Khodarovich Yu.M., Georgiev P.G. Use of transgenic animals in biotechnology: prospects and problems. *Acta Naturae*, 2013, 5(1/16): 33-46.
3. Hanna M.G. Cancer vaccines. Are we there yet? Human Vaccines. *Immunotherapeutics*, 2012, 8(8): 1161-1165.
4. Cooper C.A., Garas Klobas L.C., Maga E.A., Murray J.D. Consuming transgenic goats' milk containing the antimicrobial protein lysozyme helps resolve diarrhea in young pigs. *PLoS ONE*, 2013, 8(3): e58409.
5. Zeng W., Tang L., Bondareva A., Luo J., Megee S.O., Modelski M., Blash S., Melican D.T., Destremes M.M., Overton S.A., Gavin W.G., Ayres S., Echelard Y., Dobrinski I. Non-viral transfection of goat germline stem cells by nucleofection results in production of transgenic sperm after germ cell transplantation. *Mol. Reprod. Dev.*, 2012, 79(4): 255-261.
6. McLaren A. *Mammalian chimaeras*. Cambridge, Cambridge University Press, 1976.
7. Konyukhov B.V. Mezshvidovye khimery mlekopitayushchikh. *Ontogenez*, 1985, 16(3): 242-246.
8. Konyukhov B.V., Kupriyanov S.D., Isabekov B.S. *Uspekhi sovremennoi genetiki* [In: Achievements in modern genetics]. Moscow, 1988: 106-142.
9. McGrath J., Solter D. Nuclear transplantation in the mouse embryo by microsurgery and cell fusion. *Science*, 1983, 220: 1300-1302.
10. McGrath J., Solter D. Inability of mouse blastomere nuclei transferred to enucleated zygotes to support development in vitro. *Science*, 1984, 226: 1317-1319.
11. Willadsen S.M. Nuclear transplantation in sheep embryos. *Nature*, 1986, 320: 63-65.
12. Prather R.S., Barnes F.L., Sims M.M., Robl J.M., Eyestone W.H., First N.L. Nuclear transplantation in the bovine embryo: assessment of donor nuclei and recipient oocyte. *Biol. Reprod.*, 1987, 37: 859-866.
13. Marx J.L. Cloning sheep and cattle embryos. *Science*, 1988, 239: 463-464.
14. Faber D.C., Ferre L.B., Metzger J., Robl J.M., Kasinathan P. Agro-economic impact of cattle cloning. *Clon. Stem. Cells*, 2004, 6(2): 198-207.
15. Brooks K.R., Lusk J.L. U.S. consumers attitudes toward farm animal cloning. *Appetite*, 2011, 57(2): 483-492.
16. Murphy C., Henchion M., McCarthy M., Williams G.A. The prospects for acceptance of animal cloning in the European food chain: early insights from an Irish sentinel group. *Agr. Bio. Forum*, 2011, 14(2): 83-93.
17. Campbell K.H., McWhir J., Ritchie W.A., Wilmut I. Sheep cloned by nuclear transfer from a cultured cell line. *Nature*, 1996, 380(6569): 64-66.
18. Wilmut I., Schnieke A.E., McWhir J., Kind A.J., Campbell K.H. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature*, 1997, 385(6619): 810-813.
19. Campbell K.H.S., Ritchie W.A., Wilmut I. Nuclear—cytoplasmic interactions during the first cell cycle of nuclear transfer reconstructed bovine embryos: implications for deoxyribo-nucleic acid replication and development. *Biol. Reprod.*, 1993, 49: 933-942.
20. Harley C.B. Telomere loss: mitotic clock or genetic time bomb. *Mutat. Res.*, 1991, 256(2-6): 271-282.
21. Wang F., Yin Y., Ye X., Liu K., Zhu H., Wang L., Chiourea M., Okuka M., Ji G., Dan J., Zuo B., Li M., Zhang Q., Liu N., Chen L., Pan X., Gagos S., Keefe D. L., Liu L. Molecular

- insights into the heterogeneity of telomere reprogramming in induced pluripotent stem cells. *Cell Res.*, 2012, 22: 757-768.
22. Shiels P.G., Kind A.J., Campbell K.H., Waddington D., Wilmut I., Colman A., Schnieke A.E. Analysis of telomere lengths in cloned sheep. *Nature*, 1999, 399: 316-317.
 23. Betts D., Bordignon V., Hill J., Winger Q., Westhusin M., Smith L., King W. Reprogramming of telomerase activity and rebuilding of telomere length in cloned cattle. *PNAS USA*, 2001, 98(3): 1077-1082.
 24. Lanza R.P., Cibelli J.B., Blackwell C., Cristofalo V.J., Francis M.K., Baerlocher G.M., Mak J., Schertzer M., Chavez E.A., Sawyer N., Lansdorp P.M., West M.D. Extension of cell life-span and telomere length in animals cloned from senescent somatic cells. *Science*, 2000, 288(5466): 665-669.
 25. Mesquita F.S., Machado S.A., Drnevich J. Influence of cloning by chromatin transfer on placental gene expression at day 45 of pregnancy in cattle. *Anim. Reprod. Sci.*, 2013, 136(4): 231-244.
 26. Smith L.C., Suzuki J. Jr., Goff A.K., Fillion F., Therrien J., Murphy B.D., Kohan-Ghadr H.R., Lefebvre R., Brisville A.C., Buczinski S., Fecteau G., Percin F., Meirelles F.V. Developmental and epigenetic anomalies in cloned cattle. *Reprod. Domest. Anim.*, 2012, 47(Suppl. 4): 107-114
 27. Yun Y., Zhao G.M., Wu S.J., Li W., Lei A.M. Replacement of H1 linker histone during bovine somatic cell nuclear transfer. *Theriogenology*, 2012, 78(6): 1371-1380.
 28. Couldrey C., Wells D.N. DNA methylation at a bovine alpha satellite i repeat CpG site during development following fertilization and somatic cell nuclear transfer. *PLoS ONE*, 2013, 8(2): e55153.
 29. Kim E.Y., Park M.J., Park H.Y., Noh E.J., Noh E.H., Park K.S., Lee J.B., Jeong C.J., Riu K.Z., Park S.P. Improved cloning efficiency and developmental potential in bovine somatic cell nuclear transfer with the oosight imaging system. *Cell Reprogram.*, 2012, 14(4): 305-311.
 30. Zhou G.B., Li N. Bovine oocytes cryoinjury and how to improve their development following cryopreservation. *Anim. Biotechnol.*, 2013, 24(2): 94-106.
 31. Wang L.J., Xiong X.R., Zhang H., Li Y.Y., Li Q., Wang Y.S., Xu W.B., Hua S., Zhang Y. Defined media optimization for in vitro culture of bovine somatic cell nuclear transfer (SCNT) embryos. *Theriogenology*, 2012, 78(9): 2110-2119.
 32. Cibelli J.B., Stice S.L., Golueke P.J., Kane J.J., Jerry J., Blackwell C., Ponce de Leon F.A., Robl J.M. Cloned transgenic calves produced from nonquiescent fetal fibroblasts. *Science*, 1998, 280(5367): 1256-1258.
 33. Schnieke A.E., Kind A.J., Ritchie W.A., Myycock K., Scott A.R., Ritchie M., Wilmut I., Campbell K.H. Human factor IX transgenic sheep produced by nuclear transfer from transfected fetal fibroblasts. *Science*, 1997, 278(5346): 2130-2133.
 34. Neff K.L., Argue D.P., Ma A.C., Lee H.B., Clark K.J., Ekker S.C. Mojo Hand, a TALEN design tool for genome editing applications. *BMC Bioinformatics*, 2013, 14(1) (<http://www.biomedcentral.com/1471-2105/14/1>).
 35. Liu J., Luo Y., Zheng L., Liu Q., Yang Z., Wang Y., Su J., Quan F., Zhang Y. Establishment and characterization of fetal fibroblast cell lines for generating human lysozyme transgenic goats by somatic cell nuclear transfer. *Transgenic. Res.*, 2013 Oct., 22(5): 893-903.
 36. Campbell K.H., Fisher P., Chen W.C., Choi I., Kelly R.D., Lee J.H., Xhu J. Somatic cell nuclear transfer: past, present and future perspectives. *Theriogenology*, 2007, 68(Suppl. 1): S214-S231.
 37. Hill J.R., Winger Q.A., Long C.R., Looney C.R., Thompson J.A., Westhuhn M.E. Development rates of male bovine nuclear transfer embryos derived from adult and fetal cells. *Biol. Reprod.*, 2000, 62(5): 1135-1137.
 38. Figueroa R., Lindenmaier H., Hergenbahn M., Vang Neilson K., Boukamp P. Telomere erosion varies during in vitro aging of normal human fibroblasts from young and adult donors. *Cancer Res.*, 2000, 60: 2770-2772.
 39. Reik W., Dean W., Walter J. Epigenetic reprogramming in mammalian development. *Science*, 2001, 293(5532): 1089-1093.
 40. Evans M.J., Gurer C., Loike J.D., Wilmut I., Schnieke A.E., Schon E.A. Mitochondrial DNA genotypes in nuclear transfer-derived cloned sheep. *Nat. Genet.*, 1999, 23(1): 90-93.
 41. Sutovsky P., Moreno R.D., Ramalho-Santos J., Dominko T., Simerly C., Schatten G. Ubiquitinated sperm mitochondria, selective proteolysis, and the regulating of mitochondrial inheritance in mammalian embryos. *Biol. Reprod.*, 2000, 63(2): 582-590.
 42. Glazko V.I. *DNK tekhnologii zhivotnykh* [DNA technologies in animal husbandry]. Kiev, 1997.
 43. Dominko T., Mitalipova M., Haley B., Beyhan Z., Memili E., McKusick B., First N.L. Bovine oocyte cytoplasm supports development of embryos produced by nuclear transfer of somatic cell nuclei from various mammalian species. *Biol. Reprod.*, 1999, 60(6): 1496-1502.
 44. Imsoonthornruksa S., Srirattana K., Phewsoi W., Tunwattana W., Parnpai R., Ketudat-Cairns M. Segregation of donor cell mitochondrial DNA in gaur-bovine interspecies somatic

- cell nuclear transfer embryos, fetuses and an offspring. *Mitochondrion*, 2012, 12(5): 506-513.
45. Kishi M., Itagaki Y., Takakura R., Imamura M., Sudo T., Yoshinari M., Tanimoto M., Yasue H., Kashima N. Nuclear transfer in cattle using colostrum-derived mammary gland epithelial cells and ear-derived fibroblast cells. *Theriogenology*, 2000, 54(5): 675-684.
 46. Wakayama T., Perry A.C., Zuccotti M., Johnson K.R., Yanagimachi R. Full-term development of mice from enucleated oocytes injected with cumulus cell nuclei. *Nature*, 1998, 394(6691): 369-374.
 47. Dinnyes A., Dai Y., Barber M., Liu L., Xu J., Zhou P., Yang X. Development of cloned embryos from adult rabbit fibroblasts: effect of activation treatment and donor cell preparation. *Biol. Reprod.*, 2001, 64(1): 257-263.
 48. Kubota C., Yamakuchi H., Todoroki J., Mizoshita K., Tabara N., Barber M., Yang X. Six cloned calves produced from adult fibroblast cells after long-term culture. *PNAS USA*, 2000, 97(3): 990-995.
 49. Kato Y., Tani T., Tsunoda Y. Cloning of calves from various somatic cell types of male and female adult, newborn and fetal cows. *J. Reprod. Fertil.*, 2000, 120(2): 231-237.
 50. Shiga K., Fujita T., Hirose K., Sasae Y., Nagai T. Production of calves by transfer of nuclei from cultured somatic cells obtained from Japanese black bulls. *Theriogenology*, 1999, 52(3): 527-535.
 51. Tsapali D.S., Sekeri-Pataryas K.E., Sourlingas T.G. Study of the H1 linker histone variant, H1o, during the in vitro aging of human diploid fibroblasts. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 2000, 908: 336-340.
 52. Colato C., Albornoz M., Mellano M.L., Mellano P.H., Mellano J.I., Meltsas A., Mellano M.A., Mellano J.C., Bordignon V., Baldassarre H. Production of cloned Boer goats and Dorper sheep in Argentina. *Reprod. Fert. Devel.*, 2011, 23(1): 123 abstr.
 53. Kurome M., Zakhartchenko V., Kessler B., Gungor T., Richter A., Klymiuk N., Nagashima H., Wolf E. Developmental potential of coned transgenic porcine embryos produced by serial nuclear transfer can be improved by treatment with histone deacetylase inhibitors. *Reprod. Fertil. Dev.*, 2011, 24: 123-124.
 54. Forsberg E.J., Strelchenko N.S., Augenstein M.L., Betthausen J.M., Childs L.A., Eilertsen K.J., Enos J.M., Forsythe T.M., Golueke P.J., Koppang R.W., Lange G., Lesmeister T.L., Mallon K.S., Mell G.D., Misica P.M., Pace M.M., Pfister-Genskow M., Voelker G.R., Watt S.R., Bishop M.D. Production of cloned cattle from in vitro systems. *Biol. Reprod.*, 2002, 67: 327-333.
 55. Kubota C., Tian X.C., Yang X. Serial bull cloning by somatic cell nuclear transfer. *Nat. Biotechnol.*, 2004, 22: 693-694.
 56. Jang G., Hong S.G., Oh H.J., Kim M.K., Park J.E., Kim H.J., Kim D.Y., Lee B.C. A cloned toy poodle produced from somatic cells derived from an aged female dog. *Theriogenology*, 2008, 69: 556-563.
 57. Yin X.J., Lee H.S., Yu X.F., Kim L.H., Shin H.D., Cho S.J., Choi E.G., Kong I.K. Production of second generation cloned cats by somatic cell nuclear transfer. *Theriogenology*, 2008, 69: 1001-1006.
 58. Suzuki T., Kondo S., Wakayama T., Cizdziel P.E., Hayashizaki Y. Genome-wide analysis of abnormal H3K9 acetylation in cloned mice. *PLoS ONE*, 2008, 3: e1905.
 59. Zhou Q., Renard J.P., Le Fieck G., Brochard V., Beaujean N., Cherifi Y., Fraichard A., Cozzi J. Generation of fertile cloned rats by regulating oocyte activation. *Science*, 2003, 302: 1179 (Epub 2003 Sep 25).
 60. Chesne P., Adenot P.G., Viglietta C., Baratte M., Boulanger L., Renard J.P. Cloned rabbits produced by nuclear transfer from adult somatic cells. *Nat. Biotechnol.*, 2002, 20: 366-369.
 61. Galli C., Lagutina I., Duchi R., Colleoni S., Lazzari G. Somatic cell nuclear transfer in horses. *Reprod. Domest. Anim.*, 2008, 43(Suppl. 2): 331-337.
 62. Holden C. Genetics. First cloned mule races to finish line. *Science*, 2003, 300: 1354.
 63. Zhou H., Guo Z. Heterogeneous nuclear-transferred-embryos reconstructed with camel (*Camelus bactrianus*) skin fibroblasts and enucleated ovine oocytes and their development H-M. *Anim. Reprod. Sci.*, 2006, 95: 324-330.
 64. Keefer C.L., Keyston R., Lazaris A., Bhatia B., Begin I., Bilodeau A.S., Zhou F.J., Kafidi N., Wang B., Baldassarre H., Karatzas C.N. Production of cloned goats after nuclear transfer using adult somatic cells. *Biol. Reprod.*, 2002, 66: 199-203.
 65. Ber D.K., Li C., Asher G., Wells D.N., Oback B. Red deer cloned from antler stem cells and their differentiated progeny. *Biol. Reprod.*, 2007, 77: 384-394.
 66. Naruse K., Ijiri K., Shima A., Egami N. The production of cloned fish in the medaka (*Oryzias latipes*). *J. Exp. Zool.*, 1985, 263: 335-341.
 67. Edwards J.L., Schrick F.N., McCracken M.D., Van Amstel S.R., Hopkins F.M., Welborn M.G., Davies C.J. Cloning adult farm animals: a review of the possibilities and problems associated with somatic cell nuclear transfer. *Am. J. Reprod. Immunol.*, 2003, 50: 113-123.

68. Pang S. A review of potential analytical approaches for detecting cloned animals and their offspring in the food chain. *Government Chemist* (UK, Project RF1/3.1, report number LGC/P/2012/130), 2012: 1-34 (<http://www.governmentchemists.org.uk>).
69. Wakayama T., Yanagimachi R. Cloning the laboratory mouse. *Semin. Cell Dev. Biol.*, 1999, 10: 253-258.
70. Panarace M., Aguero J.I., Garrote M., Jauregui G., Segovia A., Cane L., Gu-tierrez J., Marfil M., Rigali F., Pugliese M., Young S., Lagioia J., Garn-il C., Forte Pontes J.E., Ereno Junio J.C., Mower S., Medina M. How healthy are clones and their progeny: 5 years of field experience. *Theriogenology*, 2007, 67: 142-151.
71. Watanabe S., Nagai T. Survival of embryos and calves derived from somatic cell nuclear transfer in cattle: a nationwide survey in Japan. *Animal Science Journal*, 2011, 82: 360-365.
72. Wells D.N., Misica P.M., Day T.A., Tervit H.R. Production of cloned lambs from an established embryonic cell line: a comparison between in vivo- and in vitro-matured cytoplasts. *Biol. Reprod.*, 1997, 57(2): 385-393.
73. Hill J.R., Roussel A.J., Cibelli J.B., Edwards J.F., Hooper N.L., Miller M.W., Thompson J.A., Looney C.R., Westhusin M.E., Robl J.M., Stice S.L. Clinical and pathologic features of cloned transgenic calves and fetuses (13 case studies). *Theriogenology*, 1999, 51: 1451-1465.
74. Pace M.M., Augenstein M.L., Betthausen J.M., Childs L.A., Eilertsen K.J., Enos J.M., Forsberg E.J., Golueke P.J., Graber D.F., Kemper J.C., Koppang R.W., Lange G., Lesmeister T.L., Mallon K.S., Mell G.D., Misica P.M., Pfister-Genskow M., Strelchenko N.S., Voelker G.R., Watt S.R., Bishop M.D. Ontogeny of cloned cattle to lactation. *Biol. Reprod.*, 2002, 67: 334-339.
75. Renard J.P., Chastant S., Chesne P., Richard C., Marchal J., Cordonnier N., Chavatte P., Vignon X. Lymphoid hypoplasia and somatic cloning. *Lancet*, 1999, 353(9163): 1489-1491.
76. Winger Q.A., Hill J.R., Spin T., Watson A.J., Kraemer D.C., Westhusin M.E. Genetic reprogramming of lactate dehydrogenase, citrate synthase, and phosphofructokinase mRNA in bovine nuclear transfer embryos produced using bovine fibroblast cell nuclei. *Mol. Reprod. Dev.*, 2000, 56(4): 458-464.
77. Hill J.R., Winger Q.A., Burghardt R.C., Westhusin M.E. Bovine nuclear transfer embryo development using cells derived from a cloned fetus. *Anim. Reprod. Sci.*, 2001, 67(1-2): 17-26.
78. Sinclair K.D., McEvoy T.G., Maxfield E.K., Maltin C.A., Young L.E., Wilmut I., Broad P.J., Robinson J.J. Aberrant fetal growth and development after in vitro culture of sheep zygotes. *J. Reprod. Fertil.*, 1999, 116(1): 177-186.
79. Peura T.T., Trounson A.O. Recycling bovine embryos for nuclear transfer. *Reprod. Fertil. Dev.*, 1998, 10(7-8): 627-632.
80. Tamashiro K.L., Wakayama T., Blanchard R.J., Blanchard D.C., Yanagimachi R. Postnatal growth and behavioral development of mice cloned from adult cumulus cells. *Biol. Reprod.*, 2000, 63(1): 328-334.
81. Li G.-P., White K.L., Bunch T.D. Review of enucleation methods and procedures used in animal cloning: State of the art. *Cloning and Stem Cells*, 2004, 6(1): 5-13.
82. Prokofiev M.I., Stepanov O.I., Komissarov A.V., Antipova T.A., Pinyugina M.V., Malenko G.P. Blind enucleation of oocytes is highly efficient in zona-free bovine cloning. *Reprod. Fert. Devel.*, 2006, 19(1): 156-157.
83. Onishi A., Iwamoto M., Akita T., Mikawa S., Takeda K., Awata T., Hanada H., Perry A.C. Pig cloning by microinjection of fetal fibroblast nuclei. *Science*, 2000, 289: 1188-1190.
84. Tani T., Shimada H., Kato Y., Tsunoda Y. Demecolcine-assisted enucleation for bovine cloning. *Cloning and Stem Cells*, 2006, 8(1): 61-66.
85. Sugimura S., Akai T., Hashiyada Y., Somfai T., Inaba Y., Hirayama M., Yamanouchi T., Matsuda H., Kobayashi S., Aikawa Y., Ohtake M., Kobayashi E., Konishi K., Imai K. Promising system for selecting healthy in vitro fertilized embryos in cattle. *PLoS ONE*, 2012, 7: e36627.
86. Koo D.B., Kang Y.K., Choi Y.H., Park J.S., Kim H.N., Oh K.B., Son D.S., Park H., Lee K.K., Han Y.M. Aberrant allocations of inner cell mass and trophectoderm cells in bovine nuclear transfer blastocysts. *Biol. Reprod.*, 2002, 67: 487-492.
87. Boiani M., Eckardt S., Leu N.A., Schler H.R., McLaughlin K.J. Pluripotency deficit in clones overcome by clone-clone aggregation: epigenetic complementation? *The EMBO J.*, 2003, 22: 5304-5312.
88. Balbach S.T., Esteves T.C., Brink T., Gentile L., McLaughlin K.J., Adjaye J.A., Boiani M. Governing cell lineage formation in cloned mouse embryos. *Dev. Biol.*, 2010, 343: 71-83.
89. Wongsrikeao P., Nagai T., Agung B., Taniguchi M., Kunishi M., Suto S., Otoi T. Improvement of transgenic cloning efficiencies by culturing recipient oocytes and donor cells with antioxidant vitamins in cattle. *Mol. Reprod. Dev.*, 2007, 74: 694-702.
90. Sugimura S., Kobayashi S., Hashiyada Y., Ohtake M., Kaneda M., Yamanouchi T., Matsuda H., Aikawa Y., Watanabe S., Nagai T., Kobayashi E., Konishi K., Imai K. Follicular growth-stimulated cows provide favorable oocytes for producing cloned embryos. *Cellular Re-*

- programming*, 2012, 14: 29-37.
91. Rizos D., Ward F., Duffy P., Boland M.P., Lonergan P. Consequences of bovine oocyte maturation, fertilization or early embryo development in vitro versus in vivo: implications for blastocyst yield and blastocyst quality. *Mol. Reprod. Dev.*, 2002, 61: 234-248.
 92. De Bem T.H., Chiaratti M.R., Rochetti R., Bressan F.F., Sangalli J.R., Miranda M.S., Pires P.R., Schwartz K.R., Sampaio R.V., Fantinato-Neto P., Pimentel J.R., Perecin F., Smith L.C., Meirelles F.V., Adona P.R., Leal C.L. Viable calves produced by somatic cell nuclear transfer using meioticblocked oocytes. *Cellular Reprogramming*, 2011, 13: 419-429.
 93. Yamanaka K., Kaneda M., Inaba Y., Saito K., Kubota K., Sakatani M., Sugimura S., Imai K., Watanabe S., Takahashi M. DNA methylation analysis on satellite I region in blastocysts obtained from somatic cell cloned cattle. *Anim. Sci. J.*, 2011, 82: 523-530.
 94. Sangalli J.R., De Bem T.H., Perecin F., Chiaratti M.R., Oliveira L.D., De Araujo R.R., Valim Pimentel J.R., Smith L.C., Meirelles F.V. Treatment of nuclear-donor cells or cloned zygotes with chromatin-modifying agents increases histone acetylation but does not improve full-term development of cloned cattle. *Cellular Reprogramming*, 2012, 14: 235-247.