

DOI: <https://doi.org/10.17816/gc630218>

Способы синхронизации клеточного цикла кариопластов для повышения результативности соматического клонирования сельскохозяйственных животных

А.С. Жукова

Федеральный исследовательский центр животноводства — ВИЖ имени академика Л.К. Эрнста, Подольск, Россия

АННОТАЦИЯ

Соматическое клонирование — способ получения генетически идентичного потомства, обладающий по ряду причин крайне низкой результативностью. Способы повышения эффективности данной процедуры направлены на оптимизацию каждого из её этапов, одним из которых является подготовка кариопластов. В большинстве экспериментов по получению клонированного потомства в качестве клеток-реципиентов применяют ооциты на стадии метафазы II мейотического деления без предварительной активации, что обуславливает выбор в качестве кариопластов соматических клеток на стадии G0/G1, наиболее оптимальной для последующего репрограммирования их ядер факторами цитоплазмы ооцитов. Для остановки клеток в данной фазе наиболее часто используют методы сывороточного голодания и/или контактного ингибирования, позволяющие остановить до 90% клеток на стадии G0/G1. Однако, несмотря на эффективность данных способов, они обладают рядом существенных ограничений, в связи с чем приобретает широкое распространение добавление в среду культивирования соматических клеток компонентов, препятствующих продвижению клеток по стадиям клеточного цикла. Преимуществом применения химических ингибиторов является способность некоторых из них оказывать протекторное воздействие на соматические клетки и в результате предотвращать индукцию апоптотических изменений. Таким образом, в настоящее время существует широкий спектр методов эффективной синхронизации клеточного цикла кариопластов, и при выборе оптимального способа следует обращать внимание на тип клеток; видовую принадлежность животных, от которых они получены; допустимую продолжительность культивирования в заданных условиях с целью минимизации негативного воздействия этих условий на жизнеспособность кариопластов.

Ключевые слова: SCNT; соматическое клонирование; синхронизация клеточного цикла; росковитин; рапамицин; сывороточное голодание; контактное ингибирование.

Как цитировать:

Жукова А.С. Способы синхронизации клеточного цикла кариопластов для повышения результативности соматического клонирования сельскохозяйственных животных // Гены и клетки. 2024. Т. 19, № 3. С. 319–333. DOI: <https://doi.org/10.17816/gc630218>

DOI: <https://doi.org/10.17816/gc630218>

Methods of karyoplast cell cycle synchronization for increasing the efficiency of somatic cloning of farm animals

Anastasia S. Zhukova

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

ABSTRACT

Somatic cloning is a method of obtaining genetically identical offspring, which for some reason have extremely low efficiency. Methods to increase the effectiveness of this procedure aimed at optimizing each of its stages, one of which is karyoplast preparation. In most experiments, to obtain cloned offspring, oocytes are used as recipient cells at the metaphase of the second meiotic division without prior activation, which determines the choice of somatic cells as karyoplasts at the G0/G1 stage, the most optimal for subsequent nuclear reprogramming by oocyte cytoplasmic factors. Serum starvation and/or contact inhibition are the most commonly used methods for arresting cells in this phase, which allows the arrest of up to 90% of cells at the G0/G1 stage. Despite the effectiveness of these methods, they have some significant limitations; therefore, the addition of components to the culture medium of somatic cells that prevent the progression of cells through the cell cycle stages is becoming widespread. Some chemical inhibitors have a protective effect on somatic cells, preventing the induction of apoptotic changes. Although the efficacy of butyrolactone I, mimosine, and aphidicolin application is controversial, several studies have attested the possibility of using these drugs to synchronize the karyoplasts. Thus, several methods can be employed for effective synchronization of the cell cycle of karyoplasts. When choosing the optimal method, the type of cells, species of animals from which they were obtained, and permissible duration of cultivation under given conditions must be considered to minimize the negative effect of conditions on karyoplast viability.

Keywords: SCNT; somatic cloning; cell cycle synchronization; roscovitine; rapamycin; serum starvation; contact inhibition.

To cite this article:

Zhukova AS. Methods of karyoplast cell cycle synchronization for increasing the efficiency of somatic cloning of farm animals. *Genes & cells*. 2024;19(3):319–333. DOI: <https://doi.org/10.17816/gc630218>

Received: 10.04.2024

Accepted: 05.06.2024

Published online: 06.08.2024

ВВЕДЕНИЕ

Соматическое клонирование (somatic cell nuclear transfer, SCNT) является технологией получения многоклеточных организмов с применением ооцитов, генетический материал которых заменён на содержимое ядер донорских клеток (кариопластов). В 1952 году на амфибиях была проведена работа, результатом которой стало получение первых клонированных животных из клеток на стадии бластоцисты [1]. Затем последовал ряд исследований, приведших к рождению млекопитающих разных видов, однако их объединяло использование в качестве кариопластов бластомеров ранних эмбрионов [2], тогда как первое клонированное потомство, при создании которого были применены соматические клетки взрослого животного, получено в 1996 году [3]. В настоящее время путём SCNT клонированы разнообразные виды млекопитающих, включая обезьян [2]. Следует отметить, что данный метод имеет потенциальное применение в различных областях сельского хозяйства и медицины: производство генетически модифицированных животных [4]; размножение ценных и сохранение вымирающих видов животных; получение эмбриональных стволовых клеток [5], обладающих доказанным терапевтическим потенциалом. Несмотря на востребованность данной процедуры, эффективность её остаётся на невысоком уровне [6–8]. Низкая результативность во многом объясняется тем, что SCNT включает в себя комплекс последовательных этапов, неоптимальные условия на любом из которых могут оказать существенное негативное влияние на развитие клонированных эмбрионов и потомства. Более того, в ряде случаев у животных-реципиентов выявляются нарушения формирования плаценты, а клонированное потомство нередко погибает от пороков развития, не совместимых с жизнью [9]. Основными стадиями технологии клонирования являются подготовка ооцитов и соматических клеток, энуклеация созревших ооцитов (цитопластов) с последующим получением комплексов ооцит–соматическая клетка, слияние цитопластов с кариопластами, активация полученных цитогрибидов, культивирование эмбрионов и их трансплантация [10, 11]. В результате многочисленных исследований, проводимых с целью получения клонированных животных, накоплен большой опыт по совершенствованию технологии SCNT. Современные способы повышения эффективности данной процедуры включают оптимизацию каждого из её этапов [11–23]. Большинство публикаций отражают достижения при работе с ооцитами: модернизацию условий их созревания с целью замедления процессов старения, снижения апоптотических изменений и продукции активных форм кислорода [13, 21]; совершенствование техники энуклеации вплоть до роботизированной [19, 23]. Ведётся поиск способов восстановления цитопластов после энуклеации, в том числе путём инъекций цитоплазмы донорских ооцитов [14]. Ведутся также работы, направленные на регуляцию наследования

митохондриальной ДНК [17]. Важное значение имеют исследования, целью которых является повышение имплантации клонированных эмбрионов как на эмбриологическом этапе [15], так и на этапе работы с животными-реципиентами. Отдельного внимания заслуживает тот факт, что условия, оптимальные для проведения SCNT одного вида животных, могут оказаться не вполне подходящими для другого вида.

Ключевым событием, определяющим эффективность SCNT, служит репрограммирование ядерного материала кариопласта цитоплазмой ооцита, в результате клетки приобретают свойства тотипотентности [24]. В процессе дифференцировки соматических клеток из стволовых происходит метилирование участков их генома, которые ответственны за связывание с транскрипционными факторами, обуславливающими поддержание плюрипотентного состояния [25]. Несмотря на стабильность эпигенетического статуса соматических клеток, в том числе терминально дифференцированных, метилирование не фиксируется необратимо, а может быть репрограммировано в эмбриональное состояние [26]. Известно, что процесс репрограммирования включает эпигенетическое и метаболическое ремоделирование, однако молекулярная регуляция, лежащая в его основе, все ещё остаётся не до конца изученной [27]. Потенциал к развитию эмбрионов, полученных в ходе клонирования, зависит от способности ядра соматической клетки к репрограммированию факторами цитоплазмы ооцита. В ходе изменений, наблюдающихся после слияния энуклеированного ооцита и донорской клетки, происходят разрушение ядерной оболочки кариопласта и преждевременная конденсация хромосом (что опосредовано высокой концентрацией содержащегося в цитоплазме ооцита фактора, способствующего созреванию (maturation-promoting factor, MPF) и представляющего собой комплекс p34^{cdc2}–циклин В [28–31]), а также последующая репликация ДНК. Замена ряда структурных компонентов хроматина на соответствующие компоненты ооцитарного происхождения, происходящая после слияния мембран кариопласта и цитопласта, необходима для удаления эпигенетических меток с ДНК, лежащего в основе репрограммирования донорских ядер в тотипотентное состояние [32–34]. Данные перестройки важны в том числе для деконденсации хроматина, необходимой для более эффективного связывания регуляторов транскрипции с их сайтами узнавания и более эффективного репрограммирования [35]. Закономерно, что интенсивность экспрессии и уровень фосфорилирования ключевых гистонов и шаперонов, степень ацетилирования и метилирования гистонов ооцита оказывают влияние на эффективность репрограммирования [36]. Чтобы повысить данный показатель, исследователи применяют различные подходы: использование ингибиторов деацетилаз [37, 38] и метилтрансфераз ДНК [39], индукцию гиперэкспрессии деметилаз [40], коррекцию аномального реметилирования ДНК [41]. Тем не менее одним из необходимых условий

является координация клеточного цикла донорской соматической клетки и ооцита-реципиента, поскольку использование донорских клеток в неподходящей фазе может приводить к повреждению хромосом вследствие их преждевременной конденсации и несвоевременного разрушения ядерной оболочки [42, 43].

Согласно результатам исследований, проведённых с целью выявления оптимальной стадии клеточного цикла кариопласта, развитие эмбрионов отмечается при использовании соматических клеток в фазах G0, G1, G2 и M [44, 45]. Принимая во внимание тот факт, что в подавляющем большинстве экспериментов по получению клонированных животных в качестве клеток-реципиентов применяют ооциты в MII-фазе мейоза (по причине высокой активности MPF) [46] без предварительной активации, для переноса следует использовать клетки с диплоидным ядром в фазе G0/G1, ожидающие репликации [31, 47]. Действительно, результаты многочисленных исследований выявляют более высокую эффективность SCNT с применением в качестве кариопласта соматических клеток в данной фазе [48]. Перенос клеток в фазе G2 приводит к нарушению развития эмбрионов вследствие репликации генома, направляемой цитоплазмой ооцита; применение кариопласта в фазе S вызывает фрагментацию хромосом [42]. Если клеточный цикл цитоплазмы реципиента войдёт в фазу G2/M, когда кариопласт находится в фазе G1/S, может произойти инициация преждевременной конденсации хромосом и распада ядерной оболочки, в то время как синтез ДНК ещё не завершён, что в свою очередь приведёт к потере хромосом и анеуплоидии [49].

Остановка клеток в стадии G0/G1 достигается несколькими путями, наиболее распространёнными среди которых являются сывороточное голодание — культивирование соматических клеток в среде, содержащей экстремально низкую концентрацию фетальной бычьей сыворотки (ФБС) [50–53], контактное ингибирование (культивирование соматических клеток до монослоя с конфлюэнтностью, близкой к 100%) [52–55] или комбинация данных способов [43, 56]. Ряд исследователей применяют химические ингибиторы клеточного цикла [57, 58].

СЫВОРОТОЧНОЕ ГОЛОДАНИЕ

Сывороточное голодание — эффективный метод обратимой остановки соматических клеток в фазе G0/G1: согласно результатам многих исследований, культивирование соматических клеток в среде с экстремально низким содержанием ФБС (0,2–0,5%) ведёт к остановке 70–90% из них в данной фазе цикла [43, 58–64]. Этот показатель повышается при увеличении продолжительности культивирования клеток в условиях сниженного содержания ФБС [43, 59, 61, 65], причём в исследовании F. Sadeghian-Nodoushan с соавт. повышение количества овечьих клеток гранулёзы в фазе G0/G1 при культивировании их в течение 48 и 72 ч было статистически значимо выше,

чем при 24-часовом культивировании в условиях сывороточного голодания [61]. Восстановление содержания сыворотки в среде до значений, достаточных для активной пролиферации (15–20%), приводит к явному увеличению количества клеток в фазах S и G2/M [59, 66].

Несмотря на широкое использование данного метода с целью синхронизации клеточного цикла кариопластов при проведении клонирования животных, необходимо принимать во внимание тот факт, что культивирование соматических клеток в среде с пониженным содержанием сыворотки в течение 48 ч ведёт к повреждению эндоплазматического ретикулума [67], а в течение 72 ч и более — к нарастанию в клетках продукции активных форм кислорода [57], изменению морфологии митохондрий [68], нарастанию фрагментации ДНК [59], повышению содержания апоптотических клеток [60, 62, 69]. Одним из последствий индукции апоптоза является изменение мембранного потенциала клеток [70], что может приводить к снижению эффективности электрослияния в ходе получения цитогридов [71]. Тем не менее, согласно результатам работы [72], использование в качестве кариопласта аннексин-позитивных и аннексин-негативных клеток не оказывало значимого влияния на количество полученных цитогридов.

О негативном эффекте применения кариопластов в стадии раннего апоптоза на эффективность SCNT свидетельствуют результаты, полученные Mdos S. Miranda с соавт.: согласно проведённому ими исследованию, применение аннексин-позитивных фибробластов в качестве донорских клеток при SCNT снижает потенциал к развитию полученных эмбрионов, ведёт к сокращению количества клеток в бластоцистах и повышает в них число апоптотических клеток [72]. В данном контексте следует отметить, что статистически значимое повышение уровня апоптоза при синхронизации цикла методом сывороточного голодания отмечается при культивировании соматических клеток в среде с пониженным содержанием ФБС в течение 48 и 72 ч, в то время как сывороточное голодание в течение 24 ч не вызывает значимого повышения количества апоптотических клеток в культуре по сравнению с клетками, культивируемыми в среде, содержащей 10% ФБС [61].

Существует мнение, что повреждения соматических клеток, вызванные культивированием в условиях сывороточного голодания, могут быть причиной низкого потенциала к развитию эмбрионов, полученных методом SCNT: в исследовании H.J. Park с соавт. выявлено, что количество эмбрионов свиней, развивающихся до стадии бластоцисты, при использовании кариопласта, синхронизированного методом сывороточного голодания в течение 72 ч, ниже по сравнению с другими методами остановки клеточного цикла [69]. В то же время, согласно результатам другого исследования [65], число коровьих бластоцист, полученных методом SCNT, при использовании кариопластов, культивированных 24 ч в среде, содержащей

0,5% ФБС, было выше по сравнению с соответствующим показателем при синхронизации фибробластов методом контактного ингибирования. Данные результаты подтверждают, что увеличение продолжительности культивирования кариопластов в условиях сывороточного голодания негативно отражается на их состоянии и, как следствие, снижает результативность SCNT.

КОНТАКТНОЕ ИНГИБИРОВАНИЕ

Вторым распространённым методом снижения пролиферативной активности, применяемым в настоящее время, является контактное ингибирование [54, 73–76]. В результате формирования плотного монослоя площадь контакта поверхности соседних клеток нарастает, вызывая ингибирование клеточного цикла, несмотря на достаточную концентрацию питательных веществ и факторов роста в культуральной среде [77]. Известно, что остановка клеток в фазе G0/G1 происходит вследствие повышения экспрессии p27Kip1 — ингибитора циклин-зависимых киназ (cyclin-dependent kinases, CDKs) [78], принимающих участие в делении клеток, а также посредством диссоциации циклина D из комплекса с CDK4 [79] с последующей её инактивацией. Важно отметить, что при контактном ингибировании снижается уровень внутриклеточной продукции активных форм кислорода по сравнению с клетками, растущими в условиях более низкой плотности [80], и отмечается активация pGC1α — ключевого регулятора энергетического обмена, участвующего в снижении концентрации активных форм кислорода и защите клеток от окислительного стресса [81]. Применение данного метода позволяет остановить 65–84% клеток на стадии G0/G1 цикла [61–63]. Следует отметить, что в соматических клетках, синхронизированных способом контактного ингибирования, уровень апоптоза соизмерим с таковым в активно делящихся клетках [61, 63]. Фактором, ограничивающим применение данного способа, является то, что в ряде случаев не удаётся достичь конfluence монослоя, достаточной для возникновения контактного ингибирования, поскольку отдельные культуры клеток, используемых в качестве кариопласта при процедуре SCNT (например, после редактирования генома), могут обладать невысокой пролиферативной активностью.

КОМБИНИРОВАННЫЙ СПОСОБ

По мнению ряда исследователей, культивирование соматических клеток до монослоя с последующей сменой культуральной среды на среду с пониженным содержанием ФБС является способом повышения числа клеток на стадии G0/G1 цикла. Так, согласно результатам L. Ma и соавт., количество овечьих фибробластов в данной фазе было статистически значимо выше при комбинированном

способе синхронизации по сравнению с группами, синхронизированными методом контактного ингибирования и сывороточного голодания: 80,07% против 66,82% и 71,24% соответственно [82]. В то же время исследование N.A. Gómez и соавт., в котором сравнивали способы синхронизации клеточного цикла бычьих фибробластов (сывороточного голодания, контактного ингибирования и комбинированного метода), не выявило значимых различий в количестве фибробластов в фазе G0/G1 [65]. Разногласия в результатах можно объяснить как неодинаковой продолжительностью культивирования клеток в заданных условиях, так и, возможно, разной видовой принадлежностью животных, от которых получены клетки, поскольку существуют данные, подтверждающие различия в восприимчивости соматических клеток, полученных от разных видов животных, к одинаковым методам синхронизации цикла [83, 84].

Эффективность синхронизации соматических клеток во многом определяется также типом клеток, используемых в качестве кариопласта: результаты исследования S. Yagcioglu и соавт., проведённого на овцах, показывают, что фетальные фибробласты и фибробласты, полученные от взрослого животного, по-разному реагируют на синхронизацию клеточного цикла [63].

ХИМИЧЕСКИЙ СПОСОБ СИНХРОНИЗАЦИИ КЛЕТОЧНОГО ЦИКЛА КАРИОПЛАСТОВ

Клеточный цикл — однонаправленный процесс, в течение которого клетка последовательно проходит разные его периоды, чётко разграниченные морфологически и биохимически, без их пропуска или возврата к предыдущим стадиям. Общепринято разделение цикла на интерфазу, включающую синтетический (S) период, когда происходит удвоение хромосом; и интервалы, отделяющие его от деления: периоды G1 и G2. В фазе G1 синтезируются белки, амплифицируются органеллы, увеличивается размер клетки, на стадии G2 осуществляются анализ корректности репликации ДНК и подготовка к митозу. Клетки в фазе G1 могут выйти из клеточного цикла и войти в фазу G0 — обратимое состояние покоя [85]. Продвижение клетки по фазам клеточного цикла регулируется способностью активированных CDKs фосфорилировать специфичные субстраты, приводя к их активации, инактивации и локализации в клетке. Активация CDKs происходит при связывании их с циклинами, концентрация и активность которых определяется фазой клеточного цикла [85, 86].

Исходя из понимания процессов, лежащих в основе продвижения клетки по фазам клеточного цикла, для остановки их в той или иной фазе применяют ингибиторы CDKs (росковитин*, бутиролактон I*, статины:

* здесь и далее — препарат не зарегистрирован в Государственном реестре лекарственных средств РФ.

ловастатин*, мевастатин*), ингибиторы репликации ДНК (афидиколин*, мимозин*, статины), полимеризации микротрубочек (нокодазол*, колхицин) [87], синтеза необходимых белков (циклогексимид*) [88]. Главными принципами синхронизации цикла соматических клеток для SCNT служат его обратимость и отсутствие токсического эффекта, в связи с чем необходимо принимать во внимание, что следствием воздействия ряда ингибиторов помимо остановки клеток в необходимой фазе цикла нередко является индукция апоптоза. В табл. 1 [57–61, 63, 69, 89–93] представлены сведения о химических ингибиторах клеточного цикла, применяемых для синхронизации донорских клеток при SCNT сельскохозяйственных животных.

Согласно данным литературы, среди препаратов для синхронизации соматических клеток, применяемых в качестве кариопласта при SCNT, наиболее часто авторы выбирают росковитин. Данный препарат способствует обратимой остановке клеток в фазе G0/G1 путём ингибирования CDK1, CDK2, CDK5, CDK7, CDK9 и MPF [65, 94–96]. Ряд исследований показали, что количество фибробластов в фазе G0/G1 при добавлении росковитина в среду культивирования соизмеримо с соответствующими показателями при синхронизации клеток методом контактного ингибирования [60, 63, 69]. Проведённое N.L. Selokar с соавт. исследование демонстрирует более высокую концентрацию фетальных фибробластов в стадии G0/G1

при культивировании их в течение 24 ч в среде, содержащей 30 мкМ росковитина, по сравнению с соответствующими показателями в группах, где синхронизация цикла осуществлялась методами контактного ингибирования или сывороточного голодания [92]. Данный показатель был соизмерим с таковым при совместном применении методов контактного ингибирования и сывороточного голодания.

Относительно протективного воздействия росковитина на клетки существуют противоречивые данные: добавление его в среду культивирования овечьих, фетальных свиных и фетальных фибробластов приводило к снижению числа клеток в стадии апоптоза [60, 63, 69], однако инкубация фибробластов пумы в среде, содержащей 15 мкМ росковитина, не отражалась статистически значимо на данном показателе [62]. Обращает на себя внимание тот факт, что использование фибробластов, культивируемых в присутствии росковитина, в качестве кариопластов при проведении SCNT приводило к увеличению относительного содержания эмбрионов, достигших стадии бластоцисты [69, 92]. В исследовании S. Hwang и соавт. число супоросных свинок-реципиентов было больше в группе, где в качестве донорских клеток при SCNT использовали фибробласты, культивируемые в присутствии росковитина [91]. Таким образом, согласно результатам большинства исследований, применение данного ингибитора для остановки соматических

Таблица 1. Ингибиторы, применяемые для синхронизации клеточного цикла кариопластов при проведении соматического клонирования сельскохозяйственных животных

Table 1. Inhibitors used for synchronizing the karyoplasts cell cycle during somatic cloning of farm animals

Ингибитор	Вид животного	Тип клеток	Количество клеток в фазе G0/G1, %	Источник
Росковитин	Овцы	Фетальные фибробласты	54,85	[63]
	Овцы	Взрослые фибробласты	63,51	
	Коровы	Фетальные фибробласты	82,8	[60]
	Овцы	Нет данных	66,64	[89]
	Свины	Фетальные фибробласты	76,3	[69]
	Коровы	Фибробласты	91,1	[90]
	Свины	Фибробласты	84,6	[91]
	Коровы	Фетальные фибробласты	96,43	[92]
Рапамицин	Свины	Фибробласты	93,6	[58]
	Коровы	Фибробласты	90	[57]
Бутиролактон I	Свины	Фетальные фибробласты	81	[59]
Трихостатин А	Овцы	Фетальные фибробласты	74,28	
	Овцы	Взрослые фибробласты	68,93	[63]
Мимозин	Овцы	Гранулёза	85,2	[61]
	Свины	Гранулёза	85,7	[93]
Афидиколин	Свины	Фетальные фибробласты	82	[59]
Нокодазол	Овцы	Гранулёза	74,6	[61]

клеток в фазе G0/G1 клеточного цикла не обладает преимуществами по сравнению с контактным ингибированием и сывороточным голоданием. В то же время имеющиеся данные о протекторном воздействии риксотицина на соматические клетки и более высоком количестве эмбрионов, развившихся до стадии бластоцисты, при применении кариопластов, культивированных в его присутствии, оправдывает использование данного ингибитора в качестве способа синхронизации соматических клеток при SCNT.

Рапамицин — макролид бактериального происхождения, способный путём ингибирования мишени mTOR (mammalian target of rapamycin) регулировать рост клеток, контролировать трансляцию белков, энергетический метаболизм и формирование цитоскелета [97]. Рапамицин поддерживает физиологию клеток путём индукции аутофагии, необходимой для своевременного удаления состаренных белков, повреждённых органелл, токсичных продуктов метаболизма и пероксисом из клетки [98, 99]; он способен снижать экспрессию циклина D1 [100–102] и генов, ответственных за синтез транспортеров глюкозы и аминокислот [58], ингибируя таким образом пролиферацию клеток и останавливая их в фазе G0/G1. Согласно результатам исследования Н. Нуи с соавт., культивирование фибробластов свиней в среде с 1 мкМ рапамицина в течение трёх дней приводило к повышению концентрации клеток в фазе G0/G1 до 93,6% по сравнению с 61% в контрольной группе. Авторы отмечают, что при использовании данных клеток в качестве кариопласта число подробившихся эмбрионов и эмбрионов, развившихся до стадии бластоцисты, было статистически значимо выше, чем в контрольной группе, в то время как фрагментация ДНК была менее выражена, а экспрессия генов, связанных с развитием (*CDX2*, *CDH1*), напротив, была выше в группе рапамицина по сравнению с контрольной [58]. Исследование, проведённое на буйволах, показало схожие результаты: содержание фибробластов в стадии G0/G1 составило 90% при культивировании в среде, содержащей рапамицин; количество фибробластов, имеющих нормальный кариотип, было больше, а число апоптотических клеток и уровень продукции активных форм кислорода, напротив, были ниже по сравнению с группой клеток, подвергавшихся действию сывороточного голодания [57].

В исследовании на фетальных фибробластах поросят [59] убедительно показана способность бутиролактона I останавливать клетки в фазе G0/G1 цикла путём ингибирования CDK1, CDK2, CDK5, CDC2 [103, 104]. Относительно влияния данного препарата на жизнеспособность клеток имеющиеся сведения противоречивы: так, при исследовании действия бутиролактона I на опухолевые клетки показана его индуцирующая апоптоз активность [105, 106], в то время как исследование действия данного препарата на гранулярные нейроны не выявило снижения их жизнеспособности [107].

Аминокислота растительного происхождения мимозин обладает ингибирующим эффектом в отношении инициации репликации ДНК и способна дозозависимо останавливать клетки в фазе G1 или S клеточного цикла. Применение мимозина в концентрации 0,5 мМ останавливало соматические клетки в фазе G1, в то время как более низкие концентрации (0,1–0,2 мМ) не предотвращали вход в фазу S [108, 109]. Согласно результатам проведённых исследований, добавление мимозина в среду культивирования позволяет остановить в фазе G0/G1 85,2% клеток гранулёзы овец [61] и 85,7% клеток гранулёзы свиней [93], что подтверждает его эффективность в синхронизации кариопластов при проведении SCNT.

Среди ингибиторов клеточного цикла, в отношении которых получены противоречивые данные, следует отметить афидиколин и нокодазол. Афидиколин — обратимый ингибитор ДНК-полимераз. Считается, что он останавливает клетки в ранней S-фазе [110], однако, согласно результатам проведённого W.A. Kues с соавт. исследования, культивирование свиных фетальных фибробластов в среде, содержащей афидиколин, привело к тому, что концентрация клеток в фазе G0/G1 составила 82%, в то время как в фазе S остановились лишь 3,9% фибробластов [59]. Кроме того, обращает на себя внимание противоречие имеющихся данных об ингибирующей активности нокодазола. Согласно результатам F. Sadeghian-Nodoushan с соавт., доля клеток гранулёзы овец в стадии G0/G1 при культивировании их в присутствии нокодазола составила 74,6% [61], в то время как в другом исследовании [111] последовательное применение афидиколина и нокодазола для синхронизации клеточного цикла свиных индуцированных плюрипотентных стволовых клеток позволило остановить 77,6% клеток на 2-й день культивирования и 72,2% — на 3-й день на стадии G2/M, а количество клеток в фазе G0/G1 составило лишь 9,4 и 11,3% на 2-й и 3-й дни соответственно. В данном контексте следует отметить, что механизмом действия нокодазола служит нарушение полимеризации микротрубочек, и это способствует остановке клеток в фазе G2/M [112]. Таким образом, данный препарат не может быть рекомендован для синхронизации соматических клеток с целью их использования в качестве кариопласта при проведении SCNT.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Успех процедуры клонирования наряду с физиологическим состоянием и жизнеспособностью ооцита-реципиента во многом определяет потенциал к репрограммированию ядерного материала соматических клеток. Доказано, что наибольшей способностью к репрограммированию обладают кариопласты на стадии G0/G1 клеточного цикла, в связи с чем выбор оптимальных условий культивирования соматических клеток, обеспечивающих высокий уровень синхронизации их клеточного цикла,

является одним из направлений повышения результативности соматического клонирования. Несмотря на разнообразие существующих методов остановки клеток в фазе G0/G1 цикла, в настоящее время среди исследователей нет единого мнения о наиболее оптимальном способе. При выборе способа синхронизации клеточного цикла следует обращать внимание на вид животного, от которого получены соматические клетки; допустимую продолжительность культивирования клеток в условиях, направленных на его остановку; влияние выбранного метода на жизнеспособность клеток и индукцию в них апоптотических изменений. Изучение влияния химических ингибиторов на клеточный цикл карิโอпластов зачастую ограничивается лишь оценкой содержания клеток в определённой фазе цикла, в то время как наибольший исследовательский интерес представляют сведения о количестве полученных эмбрионов, их приживляемости и рождении жизнеспособного потомства.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Briggs R., King T.J. Transplantation of living nuclei from blastula cells into enucleated frogs' eggs // *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1952. Vol. 38, N 5. P. 455–463. doi: 10.1073/pnas.38.5.455
2. Klinger B., Schnieke A. 25th anniversary of cloning by somatic cell nuclear transfer. Twenty-five years after Dolly: how far have we come? // *Reproduction*. 2021. Vol. 162, N 1. P. F1–F10. doi: 10.1530/REP-20-0652
3. Wilmut I., Schnieke A., McWhir J., et al. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells // *Nature*. 1997. Vol. 385, N 6619. P. 810–813. Corrected and republished from: *Nature*. 1997. Vol. 386, N 6621. P. 200. doi: 10.1038/385810a0
4. Shakweer W.M.E., Krivoruchko A.Y., Dessouki S.M., et al. A review of transgenic animal techniques and their applications // *J Genet Eng Biotechnol*. 2023. Vol. 21, N 1. P. 55. doi: 10.1186/s43141-023-00502-z
5. Lee J.E., Chung Y.G., Eum J.H., et al. An efficient SCNT technology for the establishment of personalized and public human pluripotent stem cell banks // *BMB Rep*. 2016. Vol. 49, N 4. P. 197–198. doi: 10.5483/bmbrep.2016.49.4.055
6. Keefer C.L. Artificial cloning of domestic animals // *Proc Natl Acad Sci USA*. 2015. Vol. 12, N 29. P. 8874–8878. doi: 10.1073/pnas.1501718112
7. Ogura A., Inoue K., Wakayama T. Recent advancements in cloning by somatic cell nuclear transfer // *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2013. Vol. 368, N 1609. P. 20110329. doi: 10.1098/rstb.2011.0329
8. Zhang X., Gao S., Liu X. Advance in the role of epigenetic reprogramming in somatic cell nuclear transfer-mediated embryonic development // *Stem Cells Int*. 2021. Vol. 2021. P. 6681337. doi: 10.1155/2021/6681337
9. Malin K., Witkowska-Piłaszewicz O., Papis K. The many problems of somatic cell nuclear transfer in reproductive cloning of mammals // *Theriogenology*. 2022. Vol. 189. P. 246–254. doi: 10.1016/j.theriogenology.2022.06.030
10. Лопухов А.В., Сингина Г.Н., Зиновьева Н.А. Биотехнологические основы получения клонированных эмбрионов свиней // *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2019. Т. 23, № 5. С. 527–533. EDN: LCBRWK doi: 10.18699/VJ19.521

ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

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

Конфликт интересов. Автор декларирует отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

ADDITIONAL INFORMATION

Funding source. This work was supported by the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation (State assignment FGGN-2024-0014).

Competing interests. The author declares that there are no competing interests.

11. Srirattana K., Kaneda M., Parnpai R. Strategies to improve the efficiency of somatic cell nuclear transfer // *Int J Mol Sci*. 2022. Vol. 23, N 4. P. 1969. doi: 10.3390/ijms23041969
12. Gouveia C., Huyser C., Egli D., Pepper MS. Lessons learned from somatic cell nuclear transfer // *Int J Mol Sci*. 2020. Vol. 21, N 7. P. 2314. doi: 10.3390/ijms21072314
13. Zhao Q., Qiu J., Feng Z., et al. Robotic label-free precise oocyte enucleation for improving developmental competence of cloned embryos // *IEEE Trans Biomed Eng*. 2021. Vol. 68, N 8. P. 2348–2359. doi: 10.1109/TBME.2020.3036494
14. Vazquez-Avendano J.R., Ambríz-García D.A., Cortez-Romero C. Current state of the efficiency of sheep embryo production through somatic cell nuclear transfer // *Small Rumin Res*. 2022. Vol. 212. P. 106702. doi: 10.1016/j.smallrumres.2022.106702
15. Samiec M. Molecular mechanism and application of somatic cell cloning in mammals — past, present and future // *Int J Mol Sci*. 2022. Vol. 23, N 22. P. 13786. doi: 10.3390/ijms232213786
16. Yao Y., Yang A., Li G., et al. Melatonin promotes the development of sheep transgenic cloned embryos by protecting donor and recipient cells // *Cell Cycle*. 2022. Vol. 21, N 13. P. 1360–1375. doi: 10.1080/15384101.2022.2051122
17. Wang Y., Qi J.J., Yin Y.J., et al. Ferulic acid enhances oocyte maturation and the subsequent development of bovine oocytes // *Int J Mol Sci*. 2023. Vol. 24, N 19. P. 14804. doi: 10.3390/ijms241914804
18. Himaki T., Hano K. Effects of alpha lipoic acid treatment during in vitro maturation on the development of porcine somatic cell nuclear transfer embryos // *Anim Sci J*. 2023. Vol. 94, N 1. P. e13889. doi: 10.1111/asj.13889
19. Vajta G., Lewis I.M., Trounson A.O., et al. Handmade somatic cell cloning in cattle: Analysis of factors contributing to high efficiency in vitro // *Biol Reprod*. 2003. Vol. 68, N 2. P. 571–578. doi: 10.1095/biolreprod.102.008771
20. Kang J.S., Joo M.D., Lee S.H., et al. Effect of additional cytoplasm injection on the cloned bovine embryo organelle distribution and stress mitigation // *Theriogenology*. 2024. Vol. 216. P. 12–19. doi: 10.1016/j.theriogenology.2023.11.031

21. Srirattana K., St John J.C. Manipulating the mitochondrial genome to enhance cattle embryo development // *G3 (Bethesda)*. 2017. Vol. 7, N 7. P. 2065–2080. doi: 10.1534/g3.117.042655
22. Srirattana K., St John J.C. Additional mitochondrial DNA influences the interactions between the nuclear and mitochondrial genomes in a bovine embryo model of nuclear transfer // *Sci Rep*. 2018. Vol. 8, N 1. P. 7246. doi: 10.1038/s41598-018-25516-3
23. Liao Z., Zhang J., Sun S., et al. Reprogramming mechanism dissection and trophoblast replacement application in monkey somatic cell nuclear transfer // *Nat Commun*. 2024. Vol. 15, N 1. P. 5. doi: 10.1038/s41467-023-43985-7
24. Lu F., Zhang Y. Cell totipotency: molecular features, induction, and maintenance // *Natl Sci Rev*. 2015. Vol. 2, N 2. P. 217–225. doi: 10.1093/nsr/nwv009
25. Weidgang C.E., Seufferlein T., Kleger A., Mueller M. Pluripotency factors on their lineage move // *Stem Cells Int*. 2016. Vol. 2016. P. 6838253. doi: 10.1155/2016/6838253
26. Jaenisch R., Young R. Stem cells, the molecular circuitry of pluripotency and nuclear reprogramming // *Cell*. 2008. Vol. 132, N 4. P. 567–582. doi: 10.1016/j.cell.2008.01.015
27. Hanna J.H., Saha K., Jaenisch R. Pluripotency and cellular reprogramming: facts, hypotheses, unresolved issues // *Cell*. 2010. Vol. 143, N 4. P. 508–525. doi: 10.1016/j.cell.2010.10.008
28. Czołowska R., Modliński J.A., Tarkowski A.K. Behaviour of thymocyte nuclei in non-activated and activated mouse oocytes // *J Cell Sci*. 1984. Vol. 69. P. 19–34. doi: 10.1242/jcs.69.1.19
29. Barnes F.L., Collas P., Powell R., et al. Influence of recipient oocyte cell cycle stage on DNA synthesis, nuclear envelope breakdown, chromosome constitution, and development in nuclear transplant bovine embryos // *Mol Reprod Dev*. 1993. Vol. 36, N 1. P. 33–41. doi: 10.1002/mrd.1080360106
30. Campbell K.H., Ritchie W.A., Wilmut I. Nuclear-cytoplasmic interactions during the first cell cycle of nuclear transfer reconstructed bovine embryos: implications for deoxyribonucleic acid replication and development // *Biol Reprod*. 1993. Vol. 49, N 5. P. 933–942. doi: 10.1095/biolreprod49.5.933
31. Campbell K.H.S., Choi I., Zhu J., et al. Cell cycle regulation in cloning. In: Cibelli J., Wilmut I., Jaenisch R., et al, editors. *Principles of cloning (second edition)*. San Diego: Academic Press, 2014. P. 149–160. doi: 10.1016/B978-0-12-386541-0.00012-6
32. Jullien J., Pasque V., Halley-Stott R.P., et al. Mechanisms of nuclear reprogramming by eggs and oocytes: a deterministic process? // *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2011. Vol. 12, N 7. P. 453–459. doi: 10.1038/nrm3140
33. Xu R., Zhang S., Lei A. Chromatin changes in reprogramming of mammalian somatic cells // *Rejuvenation Res*. 2014. Vol. 17, N 1. P. 3–10. doi: 10.1089/rej.2013.1455
34. Glanzner W.G., de Macedo M.P., Gutierrez K., Bordignon V. Enhancement of chromatin and epigenetic reprogramming in porcine SCNT embryos-progresses and perspectives // *Front Cell Dev Biol*. 2022. Vol. 10. P. 940197. doi: 10.3389/fcell.2022.940197
35. Gaspar-Maia A., Alajem A., Meshorer E., Ramalho-Santos M. Open chromatin in pluripotency and reprogramming // *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2011. Vol. 12, N 1. P. 36–47. Corrected and republished from: *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2011. Vol. 12, N 4. P. 273. doi: 10.1038/nrm3036
36. Gonzales-Munoz E., Cibelli J.B. Somatic cell reprogramming informed by the oocyte // *Stem Cells Dev*. 2018. Vol. 27, N 13. P. 871–887. doi: 10.1089/scd.2018.0066
37. Zhao J., Hao Y., Ross J.W., et al. Histone deacetylase inhibitors improve in vitro and in vivo developmental competence of somatic cell nuclear transfer porcine embryos // *Cell Reprogram*. 2010. Vol. 12, N 1. P. 75–83. doi: 10.1089/cell.2009.0038
38. Taweetchaipaisankul A., Jin J.X., Lee S., et al. Improved early development of porcine cloned embryos by treatment with quisinostat, a potent histone deacetylase inhibitor // *J Reprod Dev*. 2019. Vol. 65, N 2. P. 103–112. doi: 10.1262/jrd.2018-098
39. Zhai Y., Zhang Z., Yu H., et al. Dynamic methylation changes of DNA and H3K4 by RG108 improve epigenetic reprogramming of somatic cell nuclear transfer embryos in pigs // *Cell Physiol Biochem*. 2018. Vol. 50, N 4. P. 1376–1397. doi: 10.1159/000494598
40. Matoba S., Liu Y., Lu F., et al. Embryonic development following somatic cell nuclear transfer impeded by persisting histone methylation // *Cell*. 2014. Vol. 159, N 4. P. 884–895. doi: 10.1016/j.cell.2014.09.055
41. Gao R., Wang C., Gao Y., et al. Inhibition of aberrant DNA re-methylation improves post-implantation development of somatic cell nuclear transfer embryos // *Cell Stem Cell*. 2018. Vol. 23, N 3. P. 426–435. doi: 10.1016/j.stem.2018.07.017
42. Wang Z., Meissner A., Jaenisch R. Nuclear cloning and epigenetic reprogramming. In: Lanza R., Gearhart J., Hogan B., et al, editors. *Handbook of stem cells*. London: Elsevier Academic press, 2004. P. 119–127. doi: 10.1016/B978-012436643-5/50019-5
43. Nguyen V.K., Somfai T., Salamone D., et al. Optimization of donor cell cycle synchrony, maturation media and embryo culture system for somatic cell nuclear transfer in the critically endangered Vietnamese — pig // *Theriogenology*. 2021. Vol. 166. P. 21–28. doi: 10.1016/j.theriogenology.2021.02.008
44. Lai L., Tao T., Macháty Z., et al. Feasibility of producing porcine nuclear transfer embryos by using G2/M-stage fetal fibroblasts as donors // *Biol Reprod*. 2001. Vol. 65, N 5. P. 1558–1564. doi: 10.1095/biolreprod65.5.1558
45. Tani T., Kato Y., Tsunoda Y. Direct exposure of chromosomes to nonactivated ovum cytoplasm is effective for bovine somatic cell nucleus reprogramming // *Biol Reprod*. 2001. Vol. 64, N 1. P. 324–330. doi: 10.1095/biolreprod64.1.324
46. Wu B., Ignatz G., Currie W.B., et al. Dynamics of maturation-promoting factor and its constituent proteins during in vitro maturation of bovine oocytes // *Biol Reprod*. 1997. Vol. 56, N 1. P. 253–259. doi: 10.1095/biolreprod56.1.253
47. Polejaeva I.A. 25th anniversary of cloning by somatic cell nuclear transfer: generation of genetically engineered livestock using somatic cell nuclear transfer // *Reproduction*. 2021. Vol. 162, N 1. P. F11. doi: 10.1530/REP-21-0072
48. Kato Y., Tsunoda Y. Role of the donor nuclei in cloning efficiency: can the ooplasm reprogram any nucleus? // *Int J Dev Biol*. 2010. Vol. 54, N 11–12. P. 1623–1629. doi: 10.1387/ijdb.103203yk
49. Kikyo N., Wolffe A.P. Reprogramming nuclei: Insights from cloning, nuclear transfer and heterokaryons // *J Cell Sci*. 2000. Vol. 113, Pt 1. P.11–20. doi: 10.1242/jcs.113.1.11
50. Hosseini S.M., Hajian M., Moulavi F., et al. Cloned sheep blastocysts derived from oocytes enucleated manually using a pulled Pasteur pipette // *Cell Reprogram*. 2013. Vol. 15, N 1. P. 15–23. doi: 10.1089/cell.2012.0033
51. Wang Y., Liu Q., Kang J., et al. Overexpression of PGC7 in donor cells maintains the DNA methylation status of imprinted genes in goat embryos derived from somatic cell nuclear

- transfer technology // *Theriogenology*. 2020. Vol. 151. P. 86–94. doi: 10.1016/j.theriogenology.2020.04.013
- 52.** Huang Y., Zhang J., Li X., et al. Chromatin accessibility memory of donor cells disrupts bovine somatic cell nuclear transfer blastocysts development // *FASEB J*. 2023. Vol. 37, N 9. P. e23111. doi: 10.1096/fj.202300131RRR
- 53.** Sangalli J.R., Sampaio R.V., De Bem T.H.C., et al. Cattle cloning by somatic cell nuclear transfer // *Methods Mol Biol*. 2023. Vol. 2647. P. 225–244. doi: 10.1007/978-1-0716-3064-8_12
- 54.** Rim C.S., Kim Y.S., Rim C.H., et al. Effect of roscovitine pretreatment for increased utilization of small follicle-derived oocytes on developmental competence of somatic cell nuclear transfer embryos in pigs // *Anim Reprod Sci*. 2022. Vol. 241. P. 106987. doi: 10.1016/j.anireprosci.2022.106987
- 55.** Cai L., Hyun S.H., Kim E. Stem cell factor's role in enhancing the quality of fertilized and cloned porcine embryos for improved embryonic stem cell derivation // *Front Vet Sci*. 2023. Vol. 10. P. 1285530. doi: 10.3389/fvets.2023.1285530
- 56.** Hosseini S.M., Moulavi F., Foruzanfar M., et al. Effect of donor cell type and gender on the efficiency of in vitro sheep somatic cell cloning // *Small Ruminant Research*. 2008. Vol. 78, N 1–3. P. 162–168. doi: 10.1016/j.smallrumres.2008.06.004
- 57.** Xu J., Shi P., Zhao X., et al. Cell synchronization by rapamycin improves the developmental competence of buffalos (*Bubalus bubalis*) somatic cell nuclear transfer embryos // *Reprod Domest Anim*. 2021. Vol. 56, N 2. P. 313–323. doi: 10.1111/rda.13868
- 58.** Hyun H., Lee S.E., Son Y.J., et al. Cell synchronization by rapamycin improves the developmental competence of porcine SCNT embryos // *Cell Reprogram*. 2016. Vol. 18, N 3. P. 195–205. doi: 10.1089/cell.2015.0090
- 59.** Kues W.A., Anger M., Carnwath J.W., et al. Cell cycle synchronization of porcine fetal fibroblasts: effects of serum deprivation and reversible cell cycle inhibitors // *Biol Reprod*. 2000. Vol. 62, N 2. P. 412–419. doi: 10.1095/biolreprod62.2.412
- 60.** Cho S.R., Ock S.A., Yoo J.G., et al. Effects of confluent, roscovitine treatment and serum starvation on the cell-cycle synchronization of bovine foetal fibroblasts // *Reprod Domest Anim*. 2005. Vol. 40, N 2. P. 171–176. doi: 10.1111/j.1439-0531.2005.00577.x
- 61.** Sadeghian-Nodoushan F., Eftekhari-Yazdi P., Dalman A., et al. Mimosine as well as serum starvation can be used for cell cycle synchronization of sheep granulosa cells // *Chinese Journal of Biology*. 2014. Vol. 2014. P. 851736. doi: 10.1155/2014/851736
- 62.** Rodrigues L.L.V., Moura Y.B.F., Viana J.V.D.S., et al. Full confluency, serum starvation, and roscovitine for inducing arrest in the G0/G1 phase of the cell cycle in puma skin-derived fibroblast lines // *Anim Reprod*. 2023. Vol. 20, N 1. P. e20230017. doi: 10.1590/1984-3143-AR2023-0017
- 63.** Yagcioglu S., Ersoy N., Demir K., et al. Can roscovitine and trichostatin A be alternatives to standard protocols for cell cycle synchronization of ovine adult and foetal fibroblast cells? // *Reprod Domest Anim*. 2023. Vol. 58, N 9. P. 1251–1260. doi: 10.1111/rda.14425
- 64.** Zhao B., Li H., Zhang H., et al. The effect of L-carnitine supplementation during in vitro maturation on oocyte maturation and somatic cloned embryo development // *Reprod Biol*. 2024. Vol. 24, N 2. P. 100853. doi: 10.1016/j.repbio.2023.100853
- 65.** Gómez N.A., Ramírez M.M., Ruiz-Cortés Z.T. Primary fibroblast cell cycle synchronization and effects on handmade cloned (HMC) bovine embryos // *Ciênc Anim Bras*. 2018. Vol. 19. P. e48555. doi: 10.1590/1809-6891v19e-48555
- 66.** Chen M., Huang J., Yang X., et al. Serum starvation induced cell cycle synchronization facilitates human somatic cells reprogramming // *PLoS One*. 2012. Vol. 7, N 4. P. e28203. doi: 10.1371/journal.pone.0028203
- 67.** Zhang Y., Qu P., Ma X., et al. Tauroursodeoxycholic acid (TUDCA) alleviates endoplasmic reticulum stress of nuclear donor cells under serum starvation // *PLoS One*. 2018. Vol. 13, N 5. P. e0196785. doi: 10.1371/journal.pone.0196785
- 68.** Giannasi C., Niada S., Della Morte E., et al. Serum starvation affects mitochondrial metabolism of adipose-derived stem/stromal cells // *Cytotherapy*. 2023. Vol. 25, N 7. P. 704–711. doi: 10.1016/j.jcyt.2023.03.004
- 69.** Park H.J., Koo O.J., Kwon D.K., et al. Effect of roscovitine-treated donor cells on development of porcine cloned embryos // *Reprod Domest Anim*. 2010. Vol. 45, N 6. P. 1082–1088. doi: 10.1111/j.1439-0531.2009.01499.x
- 70.** Franco R., Bortner C., Cidlowski J. Potential roles of electrogenic ion transport and plasma membrane depolarization in apoptosis // *J Membrane Biol*. 2006. Vol. 209, N 1. P. 43–58. doi: 10.1007/s00232-005-0837-5
- 71.** Rols M.P. Parameters affecting cell viability following electroporation in vitro. In: Miklavčič D., editor. *Handbook of electroporation*. Cham: Springer International Publishing, 2017. P. 1449–1465. doi: 10.1007/978-3-319-32886-7_149
- 72.** Miranda Mdos S., Bressan F.F., Zecchin K.G., et al. Serum-starved apoptotic fibroblasts reduce blastocyst production but enable development to term after SCNT in cattle // *Cloning Stem Cells*. 2009. Vol. 11, N 4. P. 565–573. doi: 10.1089/clo.2009.0028
- 73.** Carvalho B.P., Cunha A.T.M., Silva B.D.M., et al. Production of transgenic cattle by somatic cell nuclear transfer (SCNT) with the human granulocyte colony-stimulation factor (hG-CSF) // *J Anim Sci Technol*. 2019. Vol. 61, N 2. P. 61–68. doi: 10.5187/jast.2019.61.2.61
- 74.** Al-Ghadi M.Q., Alhimaidi A.R., Iwamoto D., et al. The in vitro development of cloned sheep embryos treated with Scriptaid and Trichostatin (A) // *Saudi J Biol Sci*. 2020. Vol. 27, N 9. P. 2280–2286. doi: 10.1016/j.sjbs.2020.04.039
- 75.** Cortez J.V., Hardwicke K., Cuervo-Arango J., Grupen C.G. Cloning horses by somatic cell nuclear transfer: effects of oocyte source on development to foaling // *Theriogenology*. 2023. Vol. 203. P. 99–108. doi: 10.1016/j.theriogenology.2023.03.018
- 76.** Yadav P.S., Kumar D., Saini M., et al. Evaluation of postnatal growth, hematology, telomere length and semen attributes of multiple clones and re-clone of superior buffalo breeding bulls // *Theriogenology*. 2024. Vol. 213. P. 24–33. doi: 10.1016/j.theriogenology.2023.09.024
- 77.** Curto M., Cole B.K., Lallemand D., et al. Contact-dependent inhibition of EGFR signaling by Nf2/Merlin // *J Cell Biol*. 2007. Vol. 177, N 5. P. 893–903. doi: 10.1083/jcb.200703010
- 78.** Fuse T., Tanikawa M., Nakanishi M., et al. p27Kip1 expression by contact inhibition as a prognostic index of human glioma // *J Neurochem*. 2000. Vol. 74, N 4. P. 1393–1399. doi: 10.1046/j.1471-4159.2000.0741393.x
- 79.** Wieser R.J., Faust D., Dietrich C., Oesch F. p16INK4 mediates contact-inhibition of growth // *Oncogene*. 1999. Vol. 18, N 1. P. 277–281. doi: 10.1038/sj.onc.1202270
- 80.** Pani G., Colavitti R., Bedogni B., et al. A redox signaling mechanism for density-dependent inhibition of cell growth // *J Biol Chem*. 2000. Vol. 275, N 49. P. 38891–38899. doi: 10.1074/jbc.M007319200

81. Yang S., Hwang S., Jang J., et al. PGC1 α is required for the induction of contact inhibition by suppressing ROS // *Biochem Biophys Res Commun*. 2018. Vol. 501, N 3. P. 739–744. doi: 10.1016/j.bbrc.2018.05.059
82. Ma L., Liu X., Wang F., et al. Different donor cell culture methods can influence the developmental ability of cloned sheep embryos // *PLoS One*. 2015. Vol. 10, N 8. P. e0135344. doi: 10.1371/journal.pone.0135344
83. Wittayarat M., Thongphakdee A., Saikhun K., et al. Cell cycle synchronization of skin fibroblast cells in four species of family Felidae // *Reprod Domest Anim*. 2013. Vol. 4, N 2. P. 305–310. doi: 10.1111/j.1439-0531.2012.02149.x
84. Młodawska W., Mrowiec P., Bochenek M., et al. Effect of serum starvation and contact inhibition on dermal fibroblast cell cycle synchronization in two species of wild felids and domestic cat // *Annals of Animal Science*. 2022. Vol. 22, N 4. P. 1245–1255. doi: 10.2478/aoas-2022-0042
85. Высоцкая Л.В. Митотический цикл и его регуляция // *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2014. Т. 18, № 1. С. 81–92. EDN: SJCEOR
86. Wang Z. Cell cycle progression and synchronization: an overview // *Methods Mol Biol*. 2022. Vol. 2579. P. 3–23. doi: 10.1007/978-1-0716-2736-5_1
87. Banfalvi G. Overview of cell synchronization // *Methods Mol Biol*. 2011. Vol. 761. P. 1–23. doi: 10.1007/978-1-61779-182-6_1
88. Martinez Diaz M.A., Suzuki M., Kagawa M., et al. Effects of cycloheximide treatment on in-vitro development of porcine parthenotes and somatic cell nuclear transfer embryos // *Jpn J Vet Res*. 2003. Vol. 50, N 4. P. 147–155. doi: 10.14943/jjvr.50.4.147
89. Eren A., Arat S., Tuna M., et al. Effects of confluency, roscovitine and serum starvation on the cell-cycle synchronization and viability of sheep and goat adult fibroblasts // *J Biotechnol*. 2014. Vol. 185. P. S46. doi: 10.1016/j.jbiotec.2014.07.156
90. Sun X., Wang S., Zhang Y., et al. Cell-cycle synchronization of fibroblasts derived from transgenic cloned cattle ear skin: Effects of serum starvation, roscovitine and contact inhibition // *Zygote*. 2008. Vol. 16, N 2. P. 111–116. doi: 10.1017/S0967199407004522
91. Hwang S., Oh K.B., Kwon D.J., et al. Improvement of cloning efficiency in minipigs using post-thawed donor cells treated with roscovitine // *Mol Biotechnol*. 2013. Vol. 55, N 3. P. 212–216. doi: 10.1007/s12033-013-9671-7
92. Selokar N.L., Saini M., Muzaffer M., et al. Roscovitine treatment improves synchronization of donor cell cycle in G0/G1 stage and in vitro development of handmade cloned buffalo (*Bubalus bubalis*) embryos // *Cell Reprogram*. 2012. Vol. 14, N 2. P. 146–154. doi: 10.1089/cell.2011.0076
93. Vacková I., Engelová M., Marinov I., Tománek M. Cell cycle synchronization of porcine granulosa cells in G1 stage with mimosine // *Anim Reprod Sci*. 2003. Vol. 77, N 3–4. P. 235–245. doi: 10.1016/s0378-4320(03)00034-4
94. Alessi F., Quarta S., Savio M., et al. The cyclin-dependent kinase inhibitors olomoucine and roscovitine arrest human fibroblasts in G1 phase by specific inhibition of CDK2 kinase activity // *Exp Cell Res*. 1998. Vol. 245, N 1. P. 8–18. doi: 10.1006/excr.1998.4216
95. Banfalvi G. Erratum // *Methods Mol Biol*. 2017. Vol. 1524. P. E1. doi: 10.1007/978-1-4939-6603-5_22
96. Zhang M., Zhang L., Hei R., et al. CDK inhibitors in cancer therapy, an overview of recent development // *Am J Cancer Res*. 2021. Vol. 11, N 5. P. 1913–1935.
97. Cuyàs E., Corominas-Faja B., Joven J., et al. Cell cycle regulation by the nutrient-sensing mammalian target of rapamycin (mTOR) pathway // *Methods Mol Biol*. 2014. Vol. 1170. P. 113–144. doi: 10.1007/978-1-4939-0888-2_7
98. Rubinsztein D.C., Mariño G., Kroemer G. Autophagy and aging // *Cell*. 2011. Vol. 146, N 5. P. 682–695. doi: 10.1016/j.cell.2011.07.030
99. Lee J., Park J.I., Yun J.I., et al. Rapamycin treatment during in vitro maturation of oocytes improves embryonic development after parthenogenesis and somatic cell nuclear transfer in pigs // *J Vet Sci*. 2015. Vol. 16, N 3. P. 373–380. doi: 10.4142/jvs.2015.16.3.373
100. Albers M.W., Williams R.T., Brown E.J., et al. FKBP-rapamycin inhibits a cyclin-dependent kinase activity and a cyclin D1-Cdk association in early G1 of an osteosarcoma cell line // *J Biol Chem*. 1993. Vol. 268, N 30. P. 22825–22829. doi: 10.1016/S0021-9258(18)41602-X
101. Han J., Yan H. Inhibitory effect of rapamycin on the proliferation of Rhesus retinal vascular endothelial cells // *Chinese Journal of Experimental Ophthalmology*. 2014. N 3. P. 216–219.
102. Jiang F., Wang Y., Du S., et al. Rapamycin prevents retinal neovascularization by downregulation of cyclin D1 in a mouse model of oxygen-induced retinopathy // *BMC Ophthalmol*. 2020. Vol. 20, N 1. P. 44. doi: 10.1186/s12886-020-1325-5
103. Kitagawa M., Okabe T., Oginio H., et al. Butyrolactone I, a selective inhibitor of CDK2 and CDC2 kinase // *Oncogene*. 1993. Vol. 8, N 9. P. 2425–2432.
104. Liu F., Ma X.H., Ule J., et al. Regulation of cyclin-dependent kinase 5 and casein kinase 1 by metabotropic glutamate receptors // *Proc Natl Acad Sci USA*. 2001. Vol. 98, N 20. P. 11062–11068. doi: 10.1073/pnas.191353898
105. Wada M., Hosotani R., Lee J.U., et al. An exogenous CDK inhibitor, butyrolactone-I, induces apoptosis with increased Bax/Bcl-2 ratio in p53-mutated pancreatic cancer cells // *Anticancer Res*. 1998. Vol. 18, N 4A. P. 2559–2566.
106. Ghfar A.A., El-Metwally M.M., Shaaban M., et al. Production of terretonin N and butyrolactone I by Thermophilic *Aspergillus terreus* TM8 promoted apoptosis and cell death in human prostate and ovarian cancer cells // *Molecules*. 2021. Vol. 26, N 9. P. 2816. doi: 10.3390/molecules26092816
107. Monaco E.A. 3rd, Beaman-Hall C.M., Mathur A., Vallano M.L. Roscovitine, olomoucine, purvalanol: Inducers of apoptosis in maturing cerebellar granule neurons // *Biochem Pharmacol*. 2004. Vol. 67, N 10. P. 1947–1964. doi: 10.1016/j.bcp.2004.02.007
108. Krude T. Mimosine arrests proliferating human cells before onset of DNA replication in a dose-dependent manner // *Exp Cell Res*. 1999. Vol. 247, N 1. P. 148–159. doi: 10.1006/excr.1998.4342
109. Galgano P.J., Schildkraut C.L. G1/S phase synchronization using mimosine arrest // *CSH Protoc*. 2006. Vol. 2006, N 4. P. pdb.prot4488. doi: 10.1101/pdb.prot4488
110. Jackman J., O'Connor P.M. Methods for synchronizing cells at specific stages of the cell cycle // *Curr Protoc Cell Biol*. 1998. Chapter 8, Unit 8.3. doi: 10.1002/0471143030.cb0803s00
111. Kim E., Zheng Z., Jeon Y., et al. An improved system for generation of diploid cloned porcine embryos using induced pluripotent stem cells synchronized to metaphase // *PLoS One*. 2016. Vol. 11, N 7. P. e0160289. doi: 10.1371/journal.pone.0160289
112. Ho Y.S., Duh J.S., Jeng J.H., et al. Griseofulvin potentiates antitumorogenesis effects of nocodazole through induction of apoptosis and G2/M cell cycle arrest in human colorectal cancer cells // *Int J Cancer*. 2001. Vol. 91, N 3. P. 393–401. doi: 10.1002/1097-0215(200002)9999:9999<::aid-ijc1070>3.0.co;2-#

REFERENCES

- Briggs R, King TJ. Transplantation of living nuclei from blastula cells into enucleated frogs' eggs. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1952;38(5):455–463. doi: 10.1073/pnas.38.5.455
- Klinger B, Schnieke A. 25th anniversary of cloning by somatic cell nuclear transfer. Twenty-five years after Dolly: how far have we come? *Reproduction*. 2021;162(1):F1–F10. doi: 10.1530/REP-20-0652
- Wilmut I, Schnieke A, McWhir J, et al. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature*. 1997;385(6619):810–813. Corrected and republished from: *Nature* 1997;386(6621):200. doi: 10.1038/385810a0
- Shakweer WME, Krivoruchko AY, Dessouki SM, Khattab AA. A review of transgenic animal techniques and their applications. *J Genet Eng Biotechnol*. 2023;21(1):55. doi: 10.1186/s43141-023-00502-z
- Lee JE, Chung YG, Eum JH, et al. An efficient SCNT technology for the establishment of personalized and public human pluripotent stem cell banks. *BMB Rep*. 2016;49(4):197–198. doi: 10.5483/bmbrep.2016.49.4.055
- Keefer CL. Artificial cloning of domestic animals. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2015;12(29):8874–8878. doi: 10.1073/pnas.1501718112
- Ogura A, Inoue K, Wakayama T. Recent advancements in cloning by somatic cell nuclear transfer. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2013;368(1609):20110329. doi: 10.1098/rstb.2011.0329
- Zhang X, Gao S, Liu X. Advance in the role of epigenetic reprogramming in somatic cell nuclear transfer-mediated embryonic development. *Stem Cells Int*. 2021;2021b:6681337. doi: 10.1155/2021/6681337
- Malin K, Witkowska-Piłaszewicz O, Papis K. The many problems of somatic cell nuclear transfer in reproductive cloning of mammals. *Theriogenology*. 2022;189:246–254. doi: 10.1016/j.theriogenology.2022.06.030
- Lopukhov AV, Singina GN, Zinovieva NA. Biotechnological bases of the development of cloned pig embryos. *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2019;23(5):527–533. EDN: LCBRWK doi: 10.18699/VJ19.521
- Srirattana K, Kaneda M, Parnpai R. Strategies to improve the efficiency of somatic cell nuclear transfer. *Int J Mol Sci*. 2022;23:1969. doi: 10.3390/ijms23041969
- Gouveia C, Huyser C, Egli D, et al. Lessons learned from somatic cell nuclear transfer. *Int J Mol Sci*. 2020;21(7):2314. doi: 10.3390/ijms21072314
- Zhao Q, Qiu J, Feng Z, et al. Robotic label-free precise oocyte enucleation for improving developmental competence of cloned embryos. *IEEE Trans Biomed Eng*. 2021;68(8):2348–2359. doi: 10.1109/TBME.2020.3036494
- Vazquez-Avendano JR, Ambríz-García DA, Cortez-Romero C. Current state of the efficiency of sheep embryo production through somatic cell nuclear transfer. *Small Rumin Res*. 2022;212:106702. doi: 10.1016/j.smallrumres.2022.106702
- Samiec M. Molecular mechanism and application of somatic cell cloning in mammals — past, present and future. *Int J Mol Sci*. 2022;23(22):13786. doi: 10.3390/ijms232213786
- Yao Y, Yang A, Li G, et al. Melatonin promotes the development of sheep transgenic cloned embryos by protecting donor and recipient cells. *Cell Cycle*. 2022;21(13):1360–1375. doi: 10.1080/15384101.2022.2051122
- Wang Y, Qi JJ, Yin YJ, et al. Ferulic acid enhances oocyte maturation and the subsequent development of bovine oocytes. *Int J Mol Sci*. 2023;24(19):14804. doi: 10.3390/ijms241914804
- Himaki T, Hano K. Effects of alpha lipoic acid treatment during in vitro maturation on the development of porcine somatic cell nuclear transfer embryos. *Anim Sci J*. 2023;94(1):e13889. doi: 10.1111/asj.13889
- Vajta G, Lewis IM, Trounson AO, et al. Handmade somatic cell cloning in cattle: Analysis of factors contributing to high efficiency in vitro. *Biol Reprod*. 2003;68(2):571–578. doi: 10.1095/biolreprod.102.008771
- Kang JS, Joo MD, Lee SH, et al. Effect of additional cytoplasm injection on the cloned bovine embryo organelle distribution and stress mitigation. *Theriogenology*. 2024;216:12–19. doi: 10.1016/j.theriogenology.2023.11.031
- Srirattana K, St John JC. Manipulating the mitochondrial genome to enhance cattle embryo development. *G3 (Bethesda)*. 2017;7(7):2065–2080. doi: 10.1534/g3.117.042655
- Srirattana K, St. John JC. Additional mitochondrial DNA influences the interactions between the nuclear and mitochondrial genomes in a bovine embryo model of nuclear transfer. *Sci Rep*. 2018;8(1):7246. doi: 10.1038/s41598-018-25516-3
- Liao Z, Zhang J, Sun S. et al. Reprogramming mechanism dissection and trophoblast replacement application in monkey somatic cell nuclear transfer. *Nat Commun*. 2024;15(1):5. doi: 10.1038/s41467-023-43985-7
- Lu F, Zhang Y. Cell totipotency: molecular features, induction, and maintenance. *Natl Sci Rev*. 2015;2(2):217–225. doi: 10.1093/nsr/nw009
- Weidgang CE, Seufferlein T, Kleger A, Mueller M. Pluripotency factors on their lineage move. *Stem Cells Int*. 2016;2016:6838253. doi: 10.1155/2016/6838253
- Jaenisch R, Young R. Stem cells, the molecular circuitry of pluripotency and nuclear reprogramming. *Cell*. 2008;132(4):567–582. doi: 10.1016/j.cell.2008.01.015
- Hanna JH, Saha K, Jaenisch R. Pluripotency and cellular reprogramming: facts, hypotheses, unresolved issues. *Cell*. 2010;143(4):508–525. doi: 10.1016/j.cell.2010.10.008
- Czołowska R, Modliński JA, Tarkowski AK. Behaviour of thymocyte nuclei in non-activated and activated mouse oocytes. *J Cell Sci*. 1984;69:19–34. doi: 10.1242/jcs.69.1.19
- Barnes FL, Collas P, Powell R, et al. Influence of recipient oocyte cell cycle stage on DNA synthesis, nuclear envelope breakdown, chromosome constitution, and development in nuclear transplant bovine embryos. *Mol Reprod Dev*. 1993;36(1):33–41. doi: 10.1002/mrd.1080360106
- Campbell KH, Ritchie WA, Wilmut I. Nuclear-cytoplasmic interactions during the first cell cycle of nuclear transfer reconstructed bovine embryos: implications for deoxyribonucleic acid replication and development. *Biol Reprod*. 1993;49:933–942. doi: 10.1095/biolreprod49.5.933
- Campbell KHS, Choi I, Zhu J, et al. Cell cycle regulation in cloning. In: Cibelli J, Wilmut I, Jaenisch R, et al, editors. *Principles of cloning (second edition)*. San Diego: Academic Press; 2014. P. 149–160. doi: 10.1016/B978-0-12-386541-0.00012-6

32. Jullien J, Pasque V, Halley-Stott RP, et al. Mechanisms of nuclear reprogramming by eggs and oocytes: A deterministic process? *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2011;12(7):453–459. doi: 10.1038/nrm3140
33. Xu R, Zhang S, Lei A. Chromatin changes in reprogramming of mammalian somatic cells. *Rejuvenation Res.* 2014;17(1):3–10. doi: 10.1089/rej.2013.1455
34. Glanzner WG, de Macedo MP, Gutierrez K, Bordignon V. Enhancement of chromatin and epigenetic reprogramming in porcine SCNT embryos—progresses and perspectives. *Front Cell Dev Biol.* 2022;10:940197. doi: 10.3389/fcell.2022.940197
35. Gaspar-Maia A, Alajem A, Meshorer E, Ramalho-Santos M. Open chromatin in pluripotency and reprogramming. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2011;12(1):36–47. Corrected and republished from: *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2011;12(4):273. doi: 10.1038/nrm3036
36. Gonzales-Munoz E, Cibelli JB. Somatic cell reprogramming informed by the oocyte. *Stem Cells Dev.* 2018;27(13):871–887. doi: 10.1089/scd.2018.0066
37. Zhao J, Hao Y, Ross JW, et al. Histone deacetylase inhibitors improve in vitro and in vivo developmental competence of somatic cell nuclear transfer porcine embryos. *Cell Reprogram.* 2010;12(1):75–83. doi: 10.1089/cell.2009.0038
38. Taweetchaipaisankul A, Jin JX, Lee S, et al. Improved early development of porcine cloned embryos by treatment with quisinostat, a potent histone deacetylase inhibitor. *J Reprod Dev.* 2019;65(2):103–112. doi: 10.1262/jrd.2018-098
39. Zhai Y, Zhang Z, Yu H, et al. Dynamic methylation changes of DNA and H3K4 by RG108 improve epigenetic reprogramming of somatic cell nuclear transfer embryos in pigs. *Cell Physiol Biochem.* 2018;50(4):1376–1397. doi: 10.1159/000494598
40. Matoba S, Liu Y, Lu F, et al. Embryonic development following somatic cell nuclear transfer impeded by persisting histone methylation. *Cell.* 2014;159:884–895. doi: 10.1016/j.cell.2014.09.055
41. Gao R, Wang C, Gao Y, et al. Inhibition of aberrant DNA re-methylation improves post-implantation development of somatic cell nuclear transfer embryos. *Cell Stem Cell.* 2018;23:426–435.e5. doi: 10.1016/j.stem.2018.07.017
42. Wang Z, Meissner A, Jaenisch R. Nuclear cloning and epigenetic reprogramming. In: Lanza R, Gearhart J, Hogan B, et al, editors. *Handbook of stem cells.* London: Elsevier Academic press; 2004. P. 119–127. doi: 10.1016/B978-012436643-5/50019-5
43. Nguyen VK, Somfai T, Salamone D, et al. Optimization of donor cell cycle synchrony, maturation media and embryo culture system for somatic cell nuclear transfer in the critically endangered Vietnamese — pig. *Theriogenology.* 2021;166:21–28. doi: 10.1016/j.theriogenology.2021.02.008
44. Lai L, Tao T, Macháty Z, et al. Feasibility of producing porcine nuclear transfer embryos by using G2/M-stage fetal fibroblasts as donors. *Biol Reprod.* 2001;65(5):1558–1564. doi: 10.1095/biolreprod65.5.1558
45. Tani T, Kato Y, Tsunoda Y. Direct exposure of chromosomes to nonactivated ovum cytoplasm is effective for bovine somatic cell nucleus reprogramming. *Biol Reprod.* 2001;64(4):324–330. doi: 10.1095/biolreprod64.1.324
46. Wu B, Ignatz G, Currie WB, Yang X. Dynamics of maturation-promoting factor and its constituent proteins during in vitro maturation of bovine oocytes. *Biol Reprod.* 1997;56(1):253–259. doi: 10.1095/biolreprod56.1.253
47. Polejaeva IA. 25th anniversary of cloning by somatic cell nuclear transfer: generation of genetically engineered livestock using somatic cell nuclear transfer. *Reproduction.* 2021;162(1):F11. doi: 10.1530/REP-21-0072
48. Kato Y, Tsunoda Y. Role of the donor nuclei in cloning efficiency: can the ooplasm reprogram any nucleus? *Int J Dev Biol.* 2010;54:1623–1629. doi: 10.1387/ijdb.103203yk
49. Kikyo N, Wolffe AP. Reprogramming nuclei: Insights from cloning, nuclear transfer and heterokaryons. *J Cell Sci.* 2000;113(Pt 1):11–20. doi: 10.1242/jcs.113.1.11
50. Hosseini SM, Hajian M, Moulavi F, et al. Cloned sheep blastocysts derived from oocytes enucleated manually using a pulled Pasteur pipette. *Cell Reprogram.* 2013;15(1):15–23. doi: 10.1089/cell.2012.0033
51. Wang Y, Liu Q, Kang J, et al. Overexpression of PGC7 in donor cells maintains the DNA methylation status of imprinted genes in goat embryos derived from somatic cell nuclear transfer technology. *Theriogenology.* 2020;151:86–94. doi: 10.1016/j.theriogenology.2020.04.013
52. Huang Y, Zhang J, Li X, et al. Chromatin accessibility memory of donor cells disrupts bovine somatic cell nuclear transfer blastocysts development. *FASEB J.* 2023;37(9):e23111. doi: 10.1096/fj.202300131RRR
53. Sangalli JR, Sampaio RV, De Bem THC, et al. Cattle cloning by somatic cell nuclear transfer. *Methods Mol Biol.* 2023;2647:225–244. doi: 10.1007/978-1-0716-3064-8_12
54. Rim CS, Kim YS, Rim CH, et al. Effect of roscovitine pretreatment for increased utilization of small follicle-derived oocytes on developmental competence of somatic cell nuclear transfer embryos in pigs. *Anim Reprod Sci.* 2022;241:106987. doi: 10.1016/j.anireprosci.2022.106987
55. Cai L, Hyun SH, Kim E. Stem cell factor's role in enhancing the quality of fertilized and cloned porcine embryos for improved embryonic stem cell derivation. *Front Vet Sci.* 2023;10:1285530. doi: 10.3389/fvets.2023.1285530
56. Hosseini SM, Moulavi F, Foruzanfar M, et al. Effect of donor cell type and gender on the efficiency of in vitro sheep somatic cell cloning. *Small Ruminant Research.* 2008;78(1–3):162–168. doi: 10.1016/j.smallrumres.2008.06.004
57. Xu J, Shi P, Zhao X, et al. Cell synchronization by rapamycin improves the developmental competence of buffalos (*Bubalus bubalis*) somatic cell nuclear transfer embryos. *Reprod Domest Anim.* 2021;56(2):313–323. doi: 10.1111/rda.13868
58. Hyun H, Lee SE, Son YJ, et al. Cell synchronization by rapamycin improves the developmental competence of porcine SCNT embryos. *Cell Reprogram.* 2016;18(3):195–205. doi: 10.1089/cell.2015.0090
59. Kues WA, Anger M, Carnwath JW, et al. Cell cycle synchronization of porcine fetal fibroblasts: Effects of serum deprivation and reversible cell cycle inhibitors. *Biol Reprod.* 2000;62(2):412–419. doi: 10.1095/biolreprod62.2.412
60. Cho SR, Ock SA, Yoo JG, et al. Effects of confluent, roscovitine treatment and serum starvation on the cell-cycle synchronization of bovine foetal fibroblasts. *Reprod Domest Anim.* 2005;40(2):171–176. doi: 10.1111/j.1439-0531.2005.00577.x
61. Sadeghian-Nodoushan F, Eftekhari-Yazdi P, Dalman A, et al. Mimosine as well as serum starvation can be used for cell cycle synchronization of sheep granulosa cells. *Chinese Journal of Biology.* 2014;2014:851736. doi: 10.1155/2014/851736
62. Rodrigues LLV, Moura YBF, Viana JVDS, et al. Full confluency, serum starvation, and roscovitine for inducing arrest in the G0/G1 phase

- of the cell cycle in puma skin-derived fibroblast lines. *Anim Reprod.* 2023;20(1):e20230017. doi: 10.1590/1984-3143-AR2023-0017
- 63.** Yagcioglu S, Ersoy N, Demir K, et al. Can roscovitine and trichostatin A be alternatives to standard protocols for cell cycle synchronization of ovine adult and foetal fibroblast cells? *Reprod Domest Anim.* 2023;58(9):1251–1260. doi: 10.1111/rda.14425
- 64.** Zhao B, Li H, Zhang H, et al. The effect of L-carnitine supplementation during in vitro maturation on oocyte maturation and somatic cloned embryo development. *Reprod Biol.* 2024;24(2):100853. doi: 10.1016/j.repbio.2023.100853
- 65.** Gómez NA, Ramírez MM, Ruiz-Cortés ZT. Primary fibroblast cell cycle synchronization and effects on handmade cloned (HMC) bovine embryos. *Ciênc Anim Bras.* 2018;19:e48555. doi: 10.1590/1809-6891v19e-48555
- 66.** Chen M, Huang J, Yang X, et al. Serum starvation induced cell cycle synchronization facilitates human somatic cells reprogramming. *PLoS One.* 2012;7(4):e28203. doi: 10.1371/journal.pone.0028203
- 67.** Zhang Y, Qu P, Ma X, et al. Tauroursodeoxycholic acid (TUDCA) alleviates endoplasmic reticulum stress of nuclear donor cells under serum starvation. *PLoS One.* 2018;13(5):e0196785. doi: 10.1371/journal.pone.0196785
- 68.** Giannasi C, Niada S, Della Morte E, et al. Serum starvation affects mitochondrial metabolism of adipose-derived stem/stromal cells. *Cytotherapy.* 2023;25(7):704–711. doi: 10.1016/j.jcyt.2023.03.004
- 69.** Park HJ, Koo OJ, Kwon DK, et al. Effect of roscovitine-treated donor cells on development of porcine cloned embryos. *Reprod Domest Anim.* 2010;45(6):1082–1088. doi: 10.1111/j.1439-0531.2009.01499.x
- 70.** Franco R, Bortner C, Cidlowski J. Potential roles of electrogenic ion transport and plasma membrane depolarization in apoptosis. *J Membrane Biol.* 2006;209(1):43–58. doi: 10.1007/s00232-005-0837-5
- 71.** Rols MP. Parameters affecting cell viability following electroporation in vitro. In: Miklavčič D, editor. *Handbook of electroporation.* Cham: Springer International Publishing; 2017. P. 1449–1465. doi: 10.1007/978-3-319-32886-7_149
- 72.** Miranda MDS, Bressan FF, Zecchin KG, et al. Serum-starved apoptotic fibroblasts reduce blastocyst production but enable development to term after SCNT in cattle. *Cloning Stem Cells.* 2009;11(4):565–573. doi: 10.1089/clo.2009.0028
- 73.** Carvalho BP, Cunha ATM, Silva BDM, et al. Production of transgenic cattle by somatic cell nuclear transfer (SCNT) with the human granulocyte colony-stimulation factor (hG-CSF). *J Anim Sci Technol.* 2019;61(2):61–68. doi: 10.5187/jast.2019.61.2.61
- 74.** Al-Ghadi MQ, Alhimaiddi AR, Iwamoto D, et al. The in vitro development of cloned sheep embryos treated with Scriptaid and Trichostatin (A). *Saudi J Biol Sci.* 2020;27(9):2280–2286. doi: 10.1016/j.sjbs.2020.04.039
- 75.** Cortez JV, Hardwicke K, Cuervo-Arango J, Grupen CG. Cloning horses by somatic cell nuclear transfer: Effects of oocyte source on development to foaling. *Theriogenology.* 2023;203:99–108. doi: 10.1016/j.theriogenology.2023.03.018
- 76.** Yadav PS, Kumar D, Saini M, et al. Evaluation of postnatal growth, hematology, telomere length and semen attributes of multiple clones and re-clone of superior buffalo breeding bulls. *Theriogenology.* 2024;213:24–33. doi: 10.1016/j.theriogenology.2023.09.024
- 77.** Curto M, Cole BK, Lallemand D, et al. Contact-dependent inhibition of EGFR signaling by Nf2/Merlin. *J Cell Biol.* 2007;177(5):893–903. doi: 10.1083/jcb.200703010
- 78.** Fuse T, Tanikawa M, Nakanishi M, et al. p27Kip1 expression by contact inhibition as a prognostic index of human glioma. *J Neurochem.* 2000;74(4):1393–1399. doi: 10.1046/j.1471-4159.2000.0741393.x
- 79.** Wieser RJ, Faust D, Dietrich C, et al. p16INK4 mediates contact-inhibition of growth. *Oncogene.* 1999;18(1):277–281. doi: 10.1038/sj.onc.1202270
- 80.** Pani G, Colavitti R, Bedogni B, et al. A redox signaling mechanism for density-dependent inhibition of cell growth. *J Biol Chem.* 2000;275(49):38891–38899. doi: 10.1074/jbc.M007319200
- 81.** Yang S, Hwang S, Jang J, et al. PGC1 α is required for the induction of contact inhibition by suppressing ROS. *Biochem Biophys Res Commun.* 2018;501(3):739–744. doi: 10.1016/j.bbrc.2018.05.059
- 82.** Ma L, Liu X, Wang F, et al. Different donor cell culture methods can influence the developmental ability of cloned sheep embryos. *PLoS One.* 2015;10(8):e0135344. doi: 10.1371/journal.pone.0135344
- 83.** Wittayarat M, Thongphakdee A, Saikhun K, et al. Cell cycle synchronization of skin fibroblast cells in four species of family Felidae. *Reprod Domest Anim.* 2013;4(2):305–310. doi: 10.1111/j.1439-0531.2012.02149.x
- 84.** Młodawska W, Mrowiec P, Bochenek M, et al. Effect of serum starvation and contact inhibition on dermal fibroblast cell cycle synchronization in two species of wild felids and domestic cat. *Annals of Animal Science.* 2022;22(4):1245–1255. doi: 10.2478/aoas-2022-0042
- 85.** Visotskaja LV. Mitotic cycle and its regulation. *Vavilov Journal of Genetics and Breeding.* 2014;18(1):81–92. EDN: SJCEOR
- 86.** Wang Z. Cell cycle progression and synchronization: an overview. *Methods Mol Biol.* 2022;2579:3–23. doi: 10.1007/978-1-0716-2736-5_1
- 87.** Banfalvi G. Overview of cell synchronization. *Methods Mol Biol.* 2011;761:1–23. doi: 10.1007/978-1-61779-182-6_1
- 88.** Martínez Díaz MA, Suzuki M, Kagawa M, et al. Effects of cycloheximide treatment on in-vitro development of porcine parthenotes and somatic cell nuclear transfer embryos. *Jpn J Vet Res.* 2003;50(4):147–155. doi: 10.14943/jjvr.50.4.147
- 89.** Eren A, Arat S, Tuna M, et al. Effects of confluency, roscovitine and serum starvation on the cell-cycle synchronization and viability of sheep and goat adult fibroblasts. *J Biotechnol.* 2014;185:S46. doi: 10.1016/j.jbiotec.2014.07.156
- 90.** Sun X, Wang S, Zhang Y, et al. Cell-cycle synchronization of fibroblasts derived from transgenic cloned cattle ear skin: effects of serum starvation, roscovitine and contact inhibition. *Zygote.* 2008;16(2):111–116. doi: 10.1017/S0967199407004522
- 91.** Hwang S, Oh KB, Kwon DJ, et al. Improvement of cloning efficiency in minipigs using post-thawed donor cells treated with roscovitine. *Mol Biotechnol.* 2013;55(3):212–216. doi: 10.1007/s12033-013-9671-7
- 92.** Selokar NL, Saini M, Muzaffer M, et al. Roscovitine treatment improves synchronization of donor cell cycle in G0/G1 stage and in vitro development of handmade cloned buffalo (*Bubalus bubalis*) embryos. *Cell Reprogram.* 2012;14(2):146–154. doi: 10.1089/cell.2011.0076
- 93.** Vacková I, Engelová M, Marinov I, Tománek M. Cell cycle synchronization of porcine granulosa cells in G1 stage with mimosine. *Anim Reprod Sci.* 2003;77(3-4):235–245. doi: 10.1016/s0378-4320(03)00034-4
- 94.** Alessi F, Quarta S, Savio M, et al. The cyclin-dependent kinase inhibitors olomoucine and roscovitine arrest human fibroblasts in G1 phase by specific inhibition of CDK2 kinase activity. *Exp Cell Res.* 1998;245(1):8–18. doi: 10.1006/excr.1998.4216

95. Banfalvi G. Erratum. *Methods Mol Biol.* 2017;1524:E1. doi: 10.1007/978-1-4939-6603-5_22
96. Zhang M, Zhang L, Hei R, et al. CDK inhibitors in cancer therapy, an overview of recent development. *Am J Cancer Res.* 2021;11(5):1913–1935.
97. Cuyàs E, Corominas-Faja B, Joven J, Menendez JA. Cell cycle regulation by the nutrient-sensing mammalian target of rapamycin (mTOR) pathway. *Methods Mol Biol.* 2014;1170:113–144. doi: 10.1007/978-1-4939-0888-2_7
98. Rubinsztein DC, Mariño G, Kroemer G. Autophagy and aging. *Cell.* 2011;146(5):682–695. doi: 10.1016/j.cell.2011.07.030
99. Lee J, Park JI, Yun JI, et al. Rapamycin treatment during in vitro maturation of oocytes improves embryonic development after parthenogenesis and somatic cell nuclear transfer in pigs. *J Vet Sci.* 2015;16(3):373–380. doi: 10.4142/jvs.2015.16.3.373
100. Albers MW, Williams RT, Brown EJ, et al. FKBP-rapamycin inhibits a cyclin-dependent kinase activity and a cyclin D1-Cdk association in early G1 of an osteosarcoma cell line. *J Biol Chem.* 1993;268(30):22825–22829. doi: 10.1016/S0021-9258(18)41602-X
101. Han J, Yan H. Inhibitory effect of rapamycin on the proliferation of Rhesus retinal vascular endothelial cells. *Chinese Journal of Experimental Ophthalmology.* 2014;3:216–219.
102. Jiang F, Wang Y, Du S, et al. Rapamycin prevents retinal neovascularization by downregulation of cyclin D1 in a mouse model of oxygen-induced retinopathy. *BMC Ophthalmol.* 2020;20(1):44. doi: 10.1186/s12886-020-1325-5
103. Kitagawa M, Okabe T, Ogino H, et al. Butyrolactone I, a selective inhibitor of CDK2 and CDC2 kinase. *Oncogene.* 1993;8(9):2425–2432.
104. Liu F, Ma XH, Ule J, et al. Regulation of cyclin-dependent kinase 5 and casein kinase 1 by metabotropic glutamate receptors. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2001;98(20):11062–11068. doi: 10.1073/pnas.191353898
105. Wada M, Hosotani R, Lee JU, et al. An exogenous cdk inhibitor, butyrolactone-I, induces apoptosis with increased Bax/Bcl-2 ratio in p53-mutated pancreatic cancer cells. *Anticancer Res.* 1998;18(4A):2559–2566.
106. Ghfar AA, El-Metwally MM, Shaaban M, et al. Production of terretinin N and butyrolactone I by Thermophilic *Aspergillus terreus* TM8 promoted apoptosis and cell death in human prostate and ovarian cancer cells. *Molecules.* 2021;26(9):2816. doi: 10.3390/molecules26092816
107. Monaco EA 3rd, Beaman-Hall CM, Mathur A, Vallano ML. Roscovitine, olomoucine, purvalanol: Inducers of apoptosis in maturing cerebellar granule neurons. *Biochem Pharmacol.* 2004;67(10):1947–1964. doi: 10.1016/j.bcp.2004.02.007
108. Krude T. Mimosine arrests proliferating human cells before onset of DNA replication in a dose-dependent manner. *Exp Cell Res.* 1999;247(1):148–159. doi: 10.1006/excr.1998.4342
109. Galgano PJ, Schildkraut CL. G1/S phase synchronization using mimosine arrest. *CSH Protoc.* 2006;2006(4):pdb.prot4488. doi: 10.1101/pdb.prot4488
110. Jackman J, O'Connor PM. Methods for synchronizing cells at specific stages of the cell cycle. *Curr Protoc Cell Biol.* 1998;8:8.3. doi: 10.1002/0471143030.cb0803s00
111. Kim E, Zheng Z, Jeon Y, et al. An improved system for generation of diploid cloned porcine embryos using induced pluripotent stem cells synchronized to metaphase. *PLoS One.* 2016;11(7):e0160289. doi: 10.1371/journal.pone.0160289
112. Ho YS, Duh JS, Jeng JH, et al. Griseofulvin potentiates antitumorogenesis effects of nocodazole through induction of apoptosis and G2/M cell cycle arrest in human colorectal cancer cells. *Int J Cancer.* 2001;91(3):393–401. doi: 10.1002/1097-0215(200002)9999:9999<::aid-ijc1070>3.0.co;2-#

ОБ АВТОРЕ

Жукова Анастасия Сергеевна, канд. биол. наук;
адрес: Россия, 142132, Подольск, пос. Дубровицы, д. 60;
ORCID: 0000-0003-1155-014X;
eLibrary SPIN: 4590-3971;
e-mail: anastasia.s.belyaeva@gmail.com

AUTHOR'S INFO

Anastasia S. Zhukova, Cand. Sci. (Biology);
address: 60 Dubrovitsy, 142132 Podolsk, Russia;
ORCID: 0000-0003-1155-014X;
eLibrary SPIN: 4590-3971;
e-mail: anastasia.s.belyaeva@gmail.com