

NHỮNG TIẾN BỘ TRONG KỸ THUẬT HỖ TRỢ SINH SẢN: ỨNG DỤNG TRONG Y TẾ VÀ NÔNG NGHIỆP

Nguyễn Văn Thuận

Khoa Công nghệ Sinh học, Đại học Quốc tế - Đại học Quốc gia thành phố Hồ Chí Minh

Email : nvthuan@hcmiu.edu.vn*

Ngày gửi bài: 18.04.2017

Ngày chấp nhận: 26.07.2017

TÓM TẮT

Sinh sản trên động vật bậc cao là việc tạo ra thế hệ mới thông qua quá trình thụ tinh giữa trứng và tinh trùng đã chín. Ngày nay, với sự phát triển của công nghệ sinh học sinh sản hiện đại, nhiều kỹ thuật tiên tiến đã được áp dụng và có thể tạo ra thế hệ mới từ tế bào sinh dưỡng, tế bào gốc, hoặc từ trứng và tinh trùng chưa trưởng thành. Trong báo cáo này, chúng tôi sẽ trình bày những tiến bộ trong sinh sản mà chúng tôi đã nghiên cứu trong 20 năm qua; (1) Phương pháp thụ tinh bằng vi tiêm tinh trùng vào trứng (ICSI) và ứng dụng của phương pháp này vào điều trị vô sinh hoặc tạo ra động vật chuyển gen. (2) Phương pháp thụ tinh bằng tiền tinh trùng thông qua kính hiển vi (round spermatid injection) và ứng dụng trong điều trị vô sinh không có tinh trùng. (3) Phương pháp tạo ra thế hệ mới bằng tế bào sinh dưỡng (somatic nuclear transfer), hay còn gọi là nhân bản vô tính động vật (cloning animals). (4) Phương pháp tạo thế hệ mới bằng tế bào gốc kết hợp với phôi tứ bội thông qua kỹ thuật chuyển tế bào gốc vào phôi nang tứ bội. Bên cạnh đó chúng tôi cũng sẽ trình bày những ứng dụng của sự kết hợp các phương pháp sinh sản hiện đại trên trong y học và nông nghiệp.

Từ khóa: **Blastocyst injection**, ICSI, ROSI, SCNT

Technical Advances in Reproduction: Applications in Medicine and Agriculture

ABSTRACT

In mammals, reproduction is the ability to generate next generation through the fertilization of a mature egg and a sperm. Nowadays, with the development of modern reproductive biotechnology, several advanced techniques have been applied and able to generate new generations from somatic cells and stem cells or from immature eggs and sperms. In the present paper, the advances in reproduction over the past 20 years are summarized and presented including: (1) intracytoplasmic sperm injection (ICSI) and application of this method to treat infertility and production of transgenic animals, (2) round spermatid injection (ROSI) and its application on treatment of infertility without spermatozoa, (3) Somatic cell nuclear transfer (SCNT), also known as animal cloning, and (4) the method to generate new generation by pluripotent stem cells injected into tetraploid blastocysts. The application potential of the modern reproductive methods in medicine and agriculture was discussed.

Keywords: ICSI, ROSI, SCNT, Blastocyst injection.

1. NHỮNG KỸ THUẬT HỖ TRỢ SINH SẢN

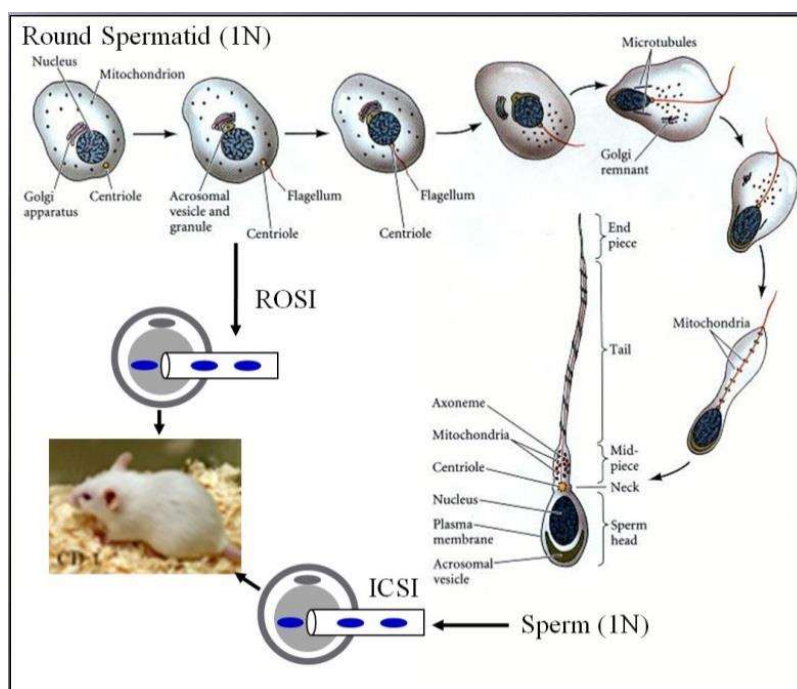
1.1. Phương pháp tạo ra thế hệ mới thông qua kỹ thuật thụ tinh bằng vi tiêm tinh trùng (intracytoplasmic sperm injection)

Thụ tinh là quá trình kết hợp giữa tinh trùng và trứng, quá trình này xảy ra trong 1/3

ống dẫn trứng ở hầu hết động vật hữu nhũ và con người. Thụ tinh bằng vi tiêm tinh trùng vào trứng (intracytoplasmic sperm injection; ICSI) là đưa trực tiếp một tinh trùng vào tế bào chất của trứng bằng kim thủy tinh vi tiêm, được thực hiện dưới kính hiển vi vi thao tác (micromanipulator microscope). Kỹ thuật này đã được thực hiện từ hơn nửa thế kỷ trước (Hiramoto, 1962), được áp

dụng trên động vật hữu nhũ (chuột lang) trong những năm 1970 (Uehara and Yanagimachi, 1976), tạo ra thế hệ mới trên thỏ vào năm 1988 (Hosoi *et al.*, 1988) và trên bò vào năm 1990 (Goto *et al.*, 1990). Ở người, kỹ thuật thụ tinh ống nghiệm đã thành công vào những năm 1978, cho ra đời em bé thụ tinh ống nghiệm đầu tiên trên thế giới “test - tube baby” và kết quả được công bố vào năm 1980 (Edwards *et al.*, 1980). Nghiên cứu này đã nhận được giải Nobel sinh lý học và y học vào năm 2010. Mặc dù thành công của ICSI trên động vật đã được chứng minh vào những năm cuối của thế kỷ 20 nhưng do rào cản của vấn đề đạo đức, đến 1992, em bé thụ tinh bằng kỹ thuật ICSI mới ra đời (Palermo *et al.*, 1992). Ngày nay hàng triệu em bé trên thế giới đã được ra đời bằng phương pháp ICSI và chủ yếu được áp dụng để điều trị vô sinh do yếu tố nam như trình trùng nồng độ thấp, tinh trùng bất hoạt, hoặc tinh trùng không có khả năng di chuyển thu nhận được từ tinh hoàn...

Ngoài điều trị vô sinh, kỹ thuật ICSI còn được ứng dụng để tạo thế hệ mới từ tinh trùng được bảo quản không cần ni tơ lỏng như freeze - dried spermatozoa (Wakayama and Yanagimachi, 1998). Gần đây, Van Thuan *et al.*, đã thành công tạo ra thế hệ mới từ tinh trùng không cần đông lạnh trên 3 tháng (Van Thuan *et al.*, 2005). Những ứng dụng này cho phép làm giảm chi phí trữ đông tinh trùng cũng như bảo tồn động vật quý hiếm bị săn bắn thông qua việc giữ tinh trùng trong dung dịch áp suất thẩm thấu cao (chỉ cần gia tăng nồng độ NaCl). Ngoài ứng dụng tạo ra thế hệ mới từ tinh trùng đã chết, kỹ thuật ICSI còn được dùng để tạo ra động vật chuyển gen bằng cách trộn tinh trùng đã trữ đông ở -20°C (với mục đích làm vỡ màng tế bào) với gens cần chuyển sau đó tiến hành vi tiêm vào trứng đã chín, kết quả đã gia tăng tỷ lệ thành công động vật chuyển gen trên 20% (Perry *et al.*, 1999). Kỹ thuật ICSI được trình bày ở hình 1.



Hình 1. Sự phát triển của tinh trùng sau khi phân bào giảm nhiễm lần 2 và quá trình thay đổi hình thái để trở thành tinh trùng hoàn chỉnh

Ghi chú: Khi tiêm tinh tử đã giảm phân lần thứ 2 (1n) vào trứng chín để tạo phôi, quy trình này được gọi là ROSI. Do tinh tử hình tròn chưa phát triển yếu tố kích hoạt tế bào nên trong trường hợp này cần kích hoạt trứng nhân tạo để tạo phôi. Kỹ thuật tiêm tinh trùng đã phát triển hoàn chỉnh (thu nhận tại mào tinh) vào trứng được gọi là kỹ thuật ICSI.

1.2. Phương pháp tạo ra thế hệ mới bằng tiền tinh trùng thông qua kỹ thuật vi tiêm (round spermatid injection, ROSI)

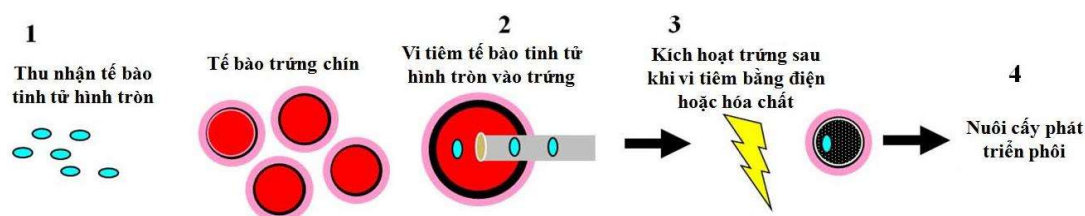
Kỹ thuật ROSI là kỹ thuật thụ tinh bằng vi tiêm tế bào tinh tử chưa chín nhưng đã trải qua phân bào giảm nhiễm lần thứ 2 ($n = 1$) và đang ở dạng hình tròn, vẫn còn tế bào chất bao quanh nhân, chưa phát triển đuôi, đặc biệt không có khả năng kích hoạt tế bào trứng. Kỹ thuật này được ứng dụng trong trường hợp tinh dịch không có tinh trùng hoặc không thu được tinh trùng từ mào tinh (epididymis) hoặc dịch hoàn (testis). Kỹ thuật này được nghiên cứu và phát triển trên động vật từ những năm cuối của thế kỷ 20 và đã tạo ra thế hệ mới bằng cách kích hoạt nhân tạo trứng (oocyte activation) sau khi vi tiêm tế bào tinh tử vào trứng ở trên chuột (Ogura *et al.*, 1994). Những nghiên cứu trên chuột cho thấy rằng thế hệ mới sinh ra từ kỹ thuật ROSI là bình thường so với kỹ thuật ICSI, tuy nhiên với tỷ lệ thành công thấp hơn (Ogura *et al.*, 1998). Một số nghiên cứu chỉ ra rằng có sự khác biệt trong quá trình biểu hiện gen ở giai đoạn phát triển sớm của phôi (Hayashi *et al.*, 2003) trong kỹ thuật ROSI. Các nghiên cứu chỉ ra rằng tế bào chất của tiền tinh tử vẫn còn và có thể ảnh hưởng lên biểu hiện của gen đối với phôi ROSI. Những nghiên cứu gần đây của nhóm chúng tôi cho thấy rằng, có thể loại bỏ tế bào chất của tế bào tiền tinh tử bằng mitoTracker trước khi ROSI và cho tỷ lệ phôi ROSI phát triển đến phôi nang và thế hệ mới cao hơn với kỹ thuật ROSI trước đây là vi tiêm toàn bộ tế bào chất và nhân của tiền tinh tử vào trứng (Kishigami *et al.*, 2004). Kỹ thuật ROSI đã được áp dụng trên người đối với các cặp vợ

chồng vô sinh do yếu tố nam và gần đây Tanaka *et al.*, 2015 báo cáo rằng 14 em bé đã ra đời bằng kỹ thuật này sau khi vi tiêm tiền tinh trùng vào 734 trứng và sau đó kích hoạt bằng điện (electro - activation). Tuy nhiên, cần phải có nhiều nghiên cứu lâm sàng hơn nữa trước khi áp dụng kỹ thuật ROSI đại trà trong điều trị vô sinh do yếu tố nam không có tinh trùng. Quy trình ROSI và kích hoạt trứng sau khi ROSI trên chuột được mô tả qua hình 1 và 2.

1.3. Nhân bản vô tính động vật từ tế bào sinh dưỡng (cloning animals)

Nhân bản vô tính trên động vật hữu nhũ đã thành công cách đây 20 năm với sự ra đời của Dolly, một chú cừu nhân bản đầu tiên của thế giới đã làm thay đổi quan điểm về tế bào cũng như khả năng tái lập trình tế bào sinh dưỡng (Wilmut *et al.*, 1997). Tuy nhiên, tỷ lệ thành công để tạo ra cá thể nhân bản vô tính vô cùng thấp, đặc biệt trên chuột (Wakayama *et al.*, 1998), với nhiều bất thường xảy ra đối với động vật nhân bản như: sự phát triển bất thường của nhau thai, béo phì, thoát vị rốn, chết trước khi sinh... (Wakayama *et al.*, 1999). Điều này được lý giải rằng quá trình tái lập trình tế bào xảy ra không hoàn chỉnh dẫn đến sự biểu hiện của gen ở phôi nhân bản bất thường (Inoue *et al.*, 2002), sự xuất hiện không đồng nhịp của các yếu tố di truyền ngoài nhân như ADN methyl hóa, histone methyl hóa và histone acetyl hóa (Kang *et al.*, 2001).

Rất nhiều nghiên cứu đã được tiến hành để gia tăng tỷ lệ thành công của nhân bản vô tính động vật cũng như giảm thiểu những bất thường xảy ra trên động vật nhân bản. Hầu hết các nhà nghiên cứu đồng ý rằng, tế bào chất của



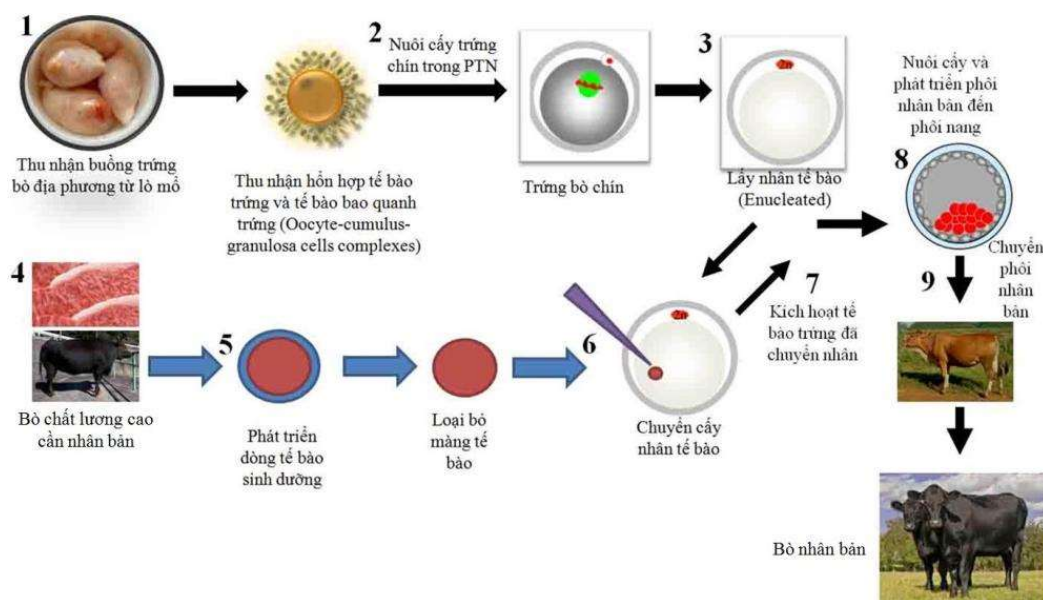
Hình 2. Quy trình tạo phôi từ tế bào tinh tử chưa trưởng thành

Ghi chú: (1) Thu nhận tế bào tinh tử từ tinh hoàn; (2) Vi tiêm tinh tử vào trứng chín; (3) Kích hoạt trứng sau khi vi tiêm; (4) Nuôi cấy và phát triển phôi.

trứng trưởng thành có hầu hết các yếu tố cần thiết để tái lập trình bộ gen của một tế bào sinh dưỡng thành tế bào toàn năng (totipotency) và vạn năng (pluripotency). Tuy nhiên trong kỹ thuật chuyển cấy nhân, một phần tế bào chất của tế bào sinh dưỡng đã được đưa vào cùng lúc với bộ gen, điều này dẫn đến sự bất thường trong quá trình tái lập trình chương trình tế bào (Van Thuan *et al.*, 2005). Hiện nay vẫn chưa có một kỹ thuật nào có thể loại bỏ hoàn toàn tế bào chất và thu nhận chỉ nhân tế bào để chuyển nhân trong kỹ thuật nhân bản vô tính. Gần đây nhóm nghiên cứu của chúng tôi phát hiện ra rằng, xử lý tế bào sinh dưỡng trước khi chuyển cấy nhân bằng chất chiết trứng non đã gia tăng đáng kể tỷ lệ thành công nhân bản vô tính (Bui *et al.*, 2008). Chúng tôi cũng phát hiện ra rằng, xử lý trứng sau khi đã chuyển nhân và trong quá trình kích hoạt tế bào bằng chất ức chế histone acetyl hóa (TSA) đã làm gia tăng vượt bậc tỷ lệ thành công nhân bản (Kishigami K *et al.*, 2006). Gần đây hơn, nghiên cứu của chúng tôi phát hiện ra rằng gia tăng histone acetyl hóa sau khi chuyển nhân, kích hoạt trứng và trong

giai đoạn 10 giờ đầu phát triển của phôi nhân bản bằng scriptaid, một chất ức chế histone acetyl hóa ít độc hại đã gia tăng quá trình sao chép mã của phôi nhân bản tại 2 tế bào và gia tăng số lượng nội tế bào bên trong phôi nang nhân bản cũng như sự xuất hiện bình thường của protein Oct4 (Van Thuan *et al.*, 2009; Van Thuan *et al.*, 2010). Với kỹ thuật này, chúng tôi lần đầu tiên trên thế giới đã nhân bản được các dòng chuột thuần chủng (inbred mice) với tỷ lệ thành công lên đến 10%. Ứng dụng những tiến bộ trên, nhóm nghiên cứu của chúng tôi lần đầu tiên trên thế giới có thể nhân bản thành công 25 thể hệ nhân bản từ một tế bào (Wakayama *et al.*, 2013). Quy trình nhân bản vô tính động vật được thể hiện chi tiết qua hình 3.

Ngày nay, kỹ thuật nhân bản vô tính động vật đã được áp dụng rộng rãi trong việc bảo tồn các giống cao sản và động vật quý hiếm. Sự kết hợp của kỹ thuật này và kỹ thuật chuyển cấy gen cũng như kỹ thuật sinh sản hiện đại có thể tạo ra động vật nhân bản chuyển gen có khả năng sản xuất protein tái tổ hợp của người (Pharming). Bên cạnh đó còn được ứng dụng để



Hình 3. Quy trình tạo phôi nhân bản và bò nhân bản từ tế bào sinh dưỡng

Ghi chú: (1) Buồng trứng được thu nhận từ lò mổ; (2) Thu nhận OCGCs từ buồng trứng và nuôi cấy chín trong PTN; (3) Thực hiện loại bỏ nhiễm sắc thể của trứng bò chín; (4) Thu nhận mô tế bào từ bò có chất lượng cao; (5) nuôi cấy thành tế bào sợi; (6) loại bỏ màng tế bào sinh dưỡng và chuyển nhân tế bào sinh dưỡng vào trứng đã loại bỏ nhiễm sắc thể; (7) Kích hoạt tế bào trứng đã được chuyển nhân; (8) Nuôi cấy phát triển phôi nhân bản trong PTN; (9) chuyển phôi nhân bản sang bò mang thai hộ và tạo bò nhân bản.

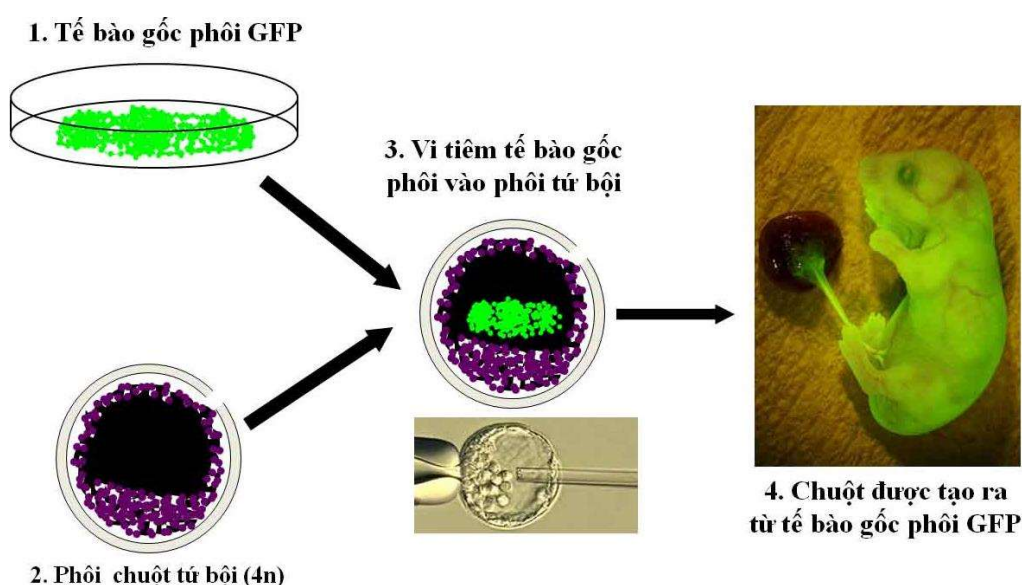
nguyên cứu cơ chế tái biệt hóa cũng như biệt hóa của tế bào. Hiện nay phòng thí nghiệm của chúng tôi đang sử dụng phương pháp này để bảo tồn và tạo phôi bò tốt đã chết của Việt nam cũng như tạo ra bò nhân bản có chất lượng thịt cao từ các nguồn tế bào bò đặc chủng và chất lượng cao trên thế giới.

1.4. Tạo thể hệ mới từ tế bào gốc và phôi tứ bội

Tế bào gốc phôi (ES cells) hoặc tế bào gốc vạn năng cảm ứng (iPS cells) có khả năng biệt hóa thành tất cả các mô và tế bào trong cơ thể. Trong khi đó, phôi tứ bội chỉ phát triển và biệt hóa thành nhau thai (placenta), do sự thoái giảm và bất hoạt của gen vạn năng Oct4 trong giai đoạn tiền làm tổ (Part *et al.*, 2011). Dựa vào đặc tính này, nhiều nhà khoa học đã thành công tạo nên thể hệ mới trên chuột bằng cách vi tiêm tế bào gốc phôi hoặc tế bào gốc vạn năng cảm ứng bào phôi tứ bội. Phương pháp này được sử dụng rộng rãi để chứng minh dòng tế bào gốc là vạn năng, đồng thời ứng dụng để tạo ra thể hệ mới từ tế bào gốc vạn năng. Sơ đồ vi tiêm tế bào gốc vào phôi tứ bội được trình bày qua hình 4.

2. KẾT LUẬN

Từ những kết quả trên, ngày nay, khái niệm tạo nên thể hệ mới không chỉ có được từ tinh trùng và trứng đã chín thông qua quá trình thụ tinh. Thể hệ mới có thể tạo ra từ tế bào giao tử chưa chín thông qua các kỹ thuật nuôi cấy phát triển trong ống nghiệm (*in vitro* growth of germ cells), nuôi cấy trứng chín trong phòng thí nghiệm (*in vitro* maturation), nuôi cấy phôi phát triển trong phòng thí nghiệm (*in vitro* development), chuyển cấy phôi (embryo transfer), kỹ thuật chuyển cấy nhân tế bào sinh dưỡng tạo động vật nhân bản (somatic cell nuclear transfer), kỹ thuật vi tiêm tế bào gốc vào phôi tứ bội (injection of stem cells into tetrablastocyst)... Ngày nay, ứng dụng của công nghệ sinh sản hiện đại không chỉ tạo ra thể hệ mới và giúp giải quyết tình trạng vô sinh trên động vật hữu nhũ mà còn được áp dụng để tạo ra động vật chuyển cấy gen có khả năng cung cấp protein tái tạo cho người ứng dụng trong y học và giúp tạo ra những động vật có chất lượng cao phục vụ cho công tác giống trong nông nghiệp. Bên cạnh đó, kỹ thuật công nghệ sinh



Hình 4. Quy trình tạo thể hệ mới bằng tế bào gốc vạn năng và phôi tứ bội trên chuột

Ghi chú: (1) Nuôi cấy và phát triển dòng tế bào gốc vạn năng từ phôi hoặc tế bào gốc vạn năng cảm ứng. (2) Tạo phôi tứ bội từ phôi thụ tinh 2 tế bào thông qua kỹ thuật dung hợp tế bào bằng kích thích điện. (3) Vi tiêm từ 12 - 15 tế bào gốc vạn năng vào phôi nang tứ bội; (4) Chuột được sinh ra có toàn bộ cơ thể được hình thành từ tế bào gốc đã chuyển gen GFP (phát sáng màu xanh lá của GFP) và nhau thai có nguồn gốc từ tế bào của phôi tứ bội (không phát sáng màu xanh lá cây)

học sinh sản hiện đại còn phục vụ cho các nghiên cứu cơ bản để tìm hiểu cơ chế tái biệt hóa và biệt hóa của tế bào, tìm hiểu nguyên nhân gây bệnh di truyền và ung thư...

LỜI CẢM ƠN

Một số nghiên cứu trong báo cáo này được tài trợ bởi Bộ Khoa học Công nghệ trong đề tài độc lập cấp quốc gia mã số “ĐTĐL. CN - 49/16”; Đại học Quốc Gia thành phố Hồ Chí Minh trong đề tài mã số “B2016 - 28 - 01”.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Bui H. T., Wakayama S., Kishigami S., Kim J. H., Van Thuan N., Wakayama T. (2008). The cytoplasm of mouse germinal vesicle stage oocytes can enhance somatic cell nuclear reprogramming. *Development*, 135: 3935 - 3945.
- Edwards R. G., Steptoe P. C. and Purdy J. M. (1980). Establishing full-term human pregnancies using cleaving embryos grown *in vitro*. *Br J. Obstet Gynecol*, 87: 737 - 756.
- Goto K., Kinoshita A., Takuma Y., Ogawa K. (1990). Fertilization in sperm injection in cattle. *Theriogenology*, 33: p. 238.
- Hayashi S., Yang J., Christenson L., Yanagimachi R., Hecht N. B. (2003). Mouse preimplantation embryos developed from oocytes injected with round spermatids or spermatozoa have similar but distinct patterns of early messenger RNA expression. *Biol Reprod.*, 69(4): 1170 - 1176.
- Hiramoto, Y. (1962). Microinjection of the live spermatozoa into sea urchin eggs. *Exp. Cell Res.*, 27: 416 - 426.
- Hosoi Y., Miyake M., Utsumi K., Iritani A. (1988). Development of rabbit oocytes after microinjection of spermatozoa. *Proc 11th Int Cong Anim Reprod A I (Dublin)*, 3(331).
- Inoue K., Kohda T., Lee J., Ogonuki N., Mochida K., Noguchi Y., Tanemura K., Kaneko - Ishino T., Ishino F., Ogura A (2002). Faithful expression of imprinted genes in cloned mice. *Science*, pp. 295: 297.
- Kang Y. K., Koo D. B., Park J. S., Choi Y. H., Chung A. S., Lee K. K., Han Y. M. (2001). Aberrant methylation of donor genome in cloned bovine embryos. *Nat Genet.*, 28: 173 - 177.
- Kishigami S., Mizutani E., Ohta H., Hikichi T., Thuan N. V., Wakayama S., Bui H. T., Wakayama T. (2006). Significant improvement of mouse cloning technique by treatment with trichostatin A after somatic nuclear transfer. *Biochem Biophys Res Commun*, 340: 183 - 189.
- Kishigami, S., Van Thuan, N., Wakayama, S., Hikichi, T., and Wakayama, T. (2004). A novel method for isolating spermatid nuclei from cytoplasm prior to ROSI in the mouse. *Zygote.*, 12(4): 321 - 327.
- Ogura A., Matsuda J., Yanagimachi R. (1994). Birth of normal young after electrofusion of mouse oocytes with round spermatids. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 91(16): 7460 - 7462.
- Palermo G., Joris H., Devroey P., Van Steirteghem A. C. (1992). Pregnancies after intracytoplasmic injection of single spermatozoon into an oocyte. *Lancet.*, 340(8810): 17 - 18.
- Perry, A. C. F., T. Wakayama, H. Kishikawa, T. Kasai, M. Okabe, Y. Toyoda, and R. Yanagimachi (1999). Mammalian transgenesis by intracytoplasmic sperm injection. *Science*, 284: 1180 - 1183.
- Tanaka A., Nagayoshi M., Takemoto Y., Tanaka I., Kusunoki H., Watanabe S., Kuroda K., Takeda S., Ito M., Yanagimachi R. (2015). Fourteen babies born after round spermatid injection into human oocytes. *Proc Natl Acad Sci. USA*, 112(47): 14629 - 14634.
- Uehara T., Yanagimachi R. (1976). Microsurgical injection of spermatozoa into hamster eggs with subsequent transformation of sperm nuclei into male pronuclei. *Biol Reprod.*, 15: 467 - 470.
- Van Thuan N., Bui H. T., Kim J. H., Hikichi T., Wakayama S., Kishigami S., Mizutani E., Wakayama T. (2009). The histone deacetylase inhibitor scriptaid enhances nascent mRNA production and rescues full - term development in cloned inbred mice. *Reproduction*, 138: 309 - 317.
- Van Thuan N., Wakayama S., Kishigami S., Wakayama T. (2005). New preservation method for mouse spermatozoa without freezing. *Biol Reprod.*, 72: 444 - 450.
- Van Thuan N., Kishigami S., Wakayama T. (2010). How to improve the success rate of mouse cloning technology. *J Reprod Dev.*, 56(1): 20 - 30.
- Van Thuan N., Wakayama S., Kishigami S., Wakayama T. (2006). Donor centrosome regulation of initial spindle formation in mouse somatic cell nuclear transfer: roles of gamma - tubulin and nuclear mitotic apparatus protein 1. *Biol Reprod.*, 74(5): 777 - 787.
- Wakayama T., Yanagimachi R. (1998). Development of normal mice from oocytes injected with freeze - dried spermatozoa. *Nat Biotechnol.*, 16: 639 - 641.
- Wakayama S., Kohda T., Obokata H., Tokoro M., Li C., Terashita Y., Mizutani E., Nguyen V. T., Kishigami S., Ishino F., Wakayama T. (2013). Successful

- serial recloning in the mouse over multiple generations. *Cell Stem Cell*, 12(3): 293 - 297.
- Wakayama T., Perry A. C. F., Zuccotti M., Johnson K. R. and Yanagimachi R. (1998). Full - term development of mice from enucleated oocytes injected with cumulus cell nuclei. *Nature*, 394: 369 - 374.
- Wilmot I., Schnieke A. E., McWhir J., Kind A. J. and Campbell K. H. (1997). Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature*, 385: 810 - 813.
- Lan Kang, Jianle Wang, Yu Zhang, Zhaohui Kou, Shaorong Gao Kang (2009). iPS cells can support full - term development of tetraploid blastocyst - complemented embryos. *Cell Stem Cell*, 5(2): 135 - 138.
- Park M. R., Lee A. R., Bui H. T., Park C., Park K. K., Cho S. G., Song H., Kim J. H., Van Thuan N., Kim J. H. (2011). Chromosome remodeling and differentiation of tetraploid embryos during preimplantation development. *Dev. Dyn.*, 240: 1660 - 1669.