

год. Ізоформи СОД вивчали методом Beauchamp і Fridovich в нашій модифікації (Кузьміна Н. В.). Крім того, в інкубованих пробах сперми вивчали виживання сперміїв (год) до припинення прямолінійного поступального руху.

Встановлено, що у спермі бугаїв є п'ять ізоформ СОД, які за швидкістю руху в 10 % ПААГ позначили, від найменш – до максимально рухливої, S1, S2, S3, S4 та S5. Їхній внесок у сумарну активність СОД є різний і залежить від типу розріджувача. Зокрема, для сперми, розрідженої 2,8 % натрію цитратом, характерний найвищий вміст S4-ізоформи ($48,6 \pm 4,95$ %), менший – S2 та S5 ($20,7 \pm 4,54$ і $13,5 \pm 3,41$ %), ще нижчий, і майже однаковий, S1 та S3 ($8,5 \pm 1,25$ та $8,8 \pm 1,77$ %). У лактозо-жовтковому розріджувачі, порівняно з 2,8 % натрію цитратом, виявлено статистично вірогідний вищий вміст S1- та S3-фракцій, відповідно, на 17,8 % та 6,8 % ($p < 0,001$), а у середовищі «Біоексель» – S3 на 12,8 % ($p < 0,001$) та S5 на 1,8 % ($p < 0,05$). При цьому, інкубування сперми у лактозо-жовтковому розріджувачі на 6,8, 12,4 та 4,5 % зменшує, відповідно, ізоформи S2, S4 та S5, а в «Біоекселі» на 2,8, 6,7 і 5,1 % знижується вміст S1-, S2- і S4-ізоформ. Відмінність у вмісті ізоформ СОД характеризує вищу тривалість виживання сперміїв: при інкубуванні в лактозо-жовтковому розріджувачі – на 17 год, а при інкубуванні в «Біоекселі» – на 62 год, порівняно з 2,8 % натрію цитратом (100 год).

УДК 636 : 57.089.3 : 606

Т. И. КУЗЬМИНА, Х. ТОРНЕР¹, Х. АЛЬМ¹

ГНУ Всероссийский научно-исследовательский институт генетики и разведения сельскохозяйственных животных, Санкт-Петербург – Пушкин, Россия

¹*Институт биологии сельскохозяйственных животных, Думмерсторф, Германия*

АКТУАЛЬНЫЕ ПРОБЛЕМЫ ИНТЕНСИФИКАЦИИ КЛЕТОЧНЫХ РЕПРОДУКТИВНЫХ ТЕХНОЛОГИЙ В ЖИВОТНОВОДСТВЕ

Внедрение инновационных клеточных репродуктивных технологий в практику животноводства, в частности, при разведении крупного рогатого скота – актуальная проблема интенсификации

Разведения і генетика тварин. 2010. № 44 © Т. И. Кузьміна, Х. Торнер, Х. Альм, 2010

селекционного процесса и генетического совершенствования существующих и создания новых пород. Рутинная технология искусственного осеменения модернизирована в последнее время за счет использования сексированных (разделенных по полу) сперматозоидов. Так, по данным фирмы Cogent (E. Lewis, 2010), первой разработавшей технологию сортирования семени, число телочек, полученных при осеменении X сперматозоидами, достигло 850000 в 40 странах мира, технология обеспечивает получение 90 % телочек, при 60 % оплодотворяемости.

В настоящее время трансплантация эмбрионов широко применяется в молочном и мясном животноводстве во многих странах мира, особенно успешно эти работы проводятся в мясном животноводстве (крупный рогатый скот), где достигнуты высокие показатели приживляемости эмбрионов и рождения живого потомства, коммерциализация данной технологии находится на высоком уровне. Однако, программа множественных пересадок (МОЕТ- полиовуляция и эмбриотрансплантация) продолжает оставаться дорогостоящей процедурой, проблемы которой сводятся к необходимости гормональной обработки животных, индивидуальному ответу доноров на вызывание суперовуляции, эффективному менеджменту. В связи с этим, в программе МОЕТ в основном используются в качестве доноров животные – рекордисты по хозяйственно-полезным признакам.

Источником эмбрионов для трансплантации также могут служить эмбрионы, полученные из ооцитов, аспирированных из яичников живых животных-доноров (OVUM PICK UP TECHNOLOGY), затем оплодотворенных вне организма (*in vitro*) или же из ооцитов яичников убитых на бойне коров, созревших, оплодотворенных и прокультивированных до бластоцисты – стадии имплантации зародышей *in vitro*.

При получении эмбрионов *in vitro* можно использовать ооциты животных разного возраста, в том числе и неполовозрелых, а также стельных (от 50 до 120 дней стельности). Оплодотворение таких яйцеклеток *in vitro* приводит к формированию от 20 % и более эмбрионов, пригодных к трансплантации. Выход телят в среднем составляет 30–40 %. Сочетание приемов суперовуляции, трансплантации эмбрионов, полученных *in vivo* и *in vitro*, криоконсервации гамет и эмбрионов позволит значительно интенсифицировать селекционный процесс, увеличить число потомков от высокопродуктивных животных, а также от коров, с заболеваниями репродуктивных органов, нару-

шением гормонального фона (не отвечающих на суперовуляцию). Как эмбриотрансплантация, так и многие другие эмбриотехнологии способствуют интенсификации селекции высокопродуктивных животных, а также получению животных, резистентных к различным заболеваниям, особей, способных продуцировать различные биологически активные вещества, используемые в фармакологии. Такие животные — результат использования методов клеточной и генетической инженерии.

К инновационным биотехнологиям репродукции, несомненно, относятся клонирование, трансгенез, получение эмбриональных стволовых клеток, для интенсивного внедрения которых в практику необходимы углубленные фундаментальные исследования. Базовый метод этих технологий — получение биологически полноценных донорских яйцеклеток, пригодных к дальнейшему оплодотворению или для получения трансгенных и клонированных животных, а также для сохранения генофонда животных путем криоконсервации женских гамет. В связи с этим, технология созревания ооцитов, выделенных из яичников убитых животных, приобретает особую актуальность. Получение биологически полноценных, зрелых яйцеклеток зависит от множества факторов, детерминирующих судьбу ооцита — развитие при последующем оплодотворении в эмбрион или же его элиминацию из яичника в результате апоптозных изменений. К таким факторам относятся диаметр фолликула, статус хроматина половых и соматических фолликулярных клеток, уровень метаболической активности митохондрий и др. Разработка эффективных прижизненных морфофункциональных тестов качества донорских ооцитов — важная задача эмбриотехнологов. Популяция донорских ооцитов гетерогенна, как по морфологическим параметрам, так и по функциональному состоянию. Раннее прогнозирование качества ооцитов, выделенных из антральных овариальных фолликулов, позволяет интенсифицировать дальнейшие этапы многоступенчатой технологии экстракорпорального созревания и оплодотворения ооцитов. Использование витального красителя ВСВ (brillant cresyl blue — бриллиантовый кристаллический голубой) позволяет тестировать растущие и завершившие стадию роста ооциты. ВСВ является витальным красителем, который детерминирует внутриклеточную активность глюкозо-6-фосфат дегидрогеназы (G6PDH). Фермент G6PDH активен в растущих ооцитах — ВСВ(-), однако, в завершивших стадию роста клетках, снижает свою активность (Rodriguez-

Gonzalez et al., 2002). ВСВ — тест основан на способности G6PDH конвертировать окраску ВСВ из голубой в бесцветную в растущих ооцитах, а в цитоплазме завершивших стадию роста ооцитах — ВСВ(+) не теряет цвет. При оплодотворении ВСВ (+) и ВСВ (-) ооцитов были получены следующие результаты: максимальные показатели по развитию эмбрионов до стадии 8–16 клеток были отмечены при оплодотворении ВСВ (+) ооцитов, созревших в среде 199 совместно с сывороткой, пролактином и клетками гранулезы (76 %), стадии бластоцисты достигли 38 % эмбрионов. При проведении экспериментов по клонированию эмбрионов, ВСВ тестирование обеспечило высокий выход клонированных эмбрионов коров после пересадки соматических ядер ушного эпителия быка в ВСВ (+) ооциты. Так, выход эмбрионов на стадии бластоцисты, полученных из реконструированных ВСВ (+) ооцитов составил 39 %, из ВСВ (-) ооцитов — лишь 4 % ($P < 0,05$). Именно после пересадки клонированного эмбриона на стадии бластоцисты, полученного из ВСВ (+) ооцита, получено жизнеспособное потомство (бычок).

Проведенные исследования позволили нам предложить эффективный тест для оценки исходной популяции донорских ооцитов коров (ВСВ — диагностика), разработать и обосновать целесообразность введения в системы культивирования ооцитов структурных элементов фолликула, что обеспечило при дальнейшем оплодотворении ооцитов, увеличение выхода из них биологически полноценных эмбрионов (от 20 до 38 %). Для интенсификации технологий клонирования, трансгенеза сельскохозяйственных животных предложены комплексные метаболические экспресс-тесты качества донорских яйцеклеток с учетом: морфологической оценки ооцит-кумулясного комплекса, состояния хроматина, активности митохондрий и их интрацитоплазматической локализации (митохондриальный тест), содержания кальция во внутриклеточных депо ооцитов и эмбрионов сельскохозяйственных животных, уровня апоптозов в соматических и половых клетках фолликулов и доимплантационных эмбрионах. Дальнейшее углубление знаний фундаментальных основ формирования зрелой яйцеклетки, будет способствовать эффективному использованию маркеров ядерно-цитоплазматического созревания ооцитов с целью интенсификации систем культивирования для получения *in vitro* биологически полноценных яйцеклеток, используемых в клеточных репродуктивных технологиях.