

ГЕНЕТИКА, РАЗВЕДЕНИЕ, СЕЛЕКЦИЯ, БИОТЕХНОЛОГИЯ РАЗМНОЖЕНИЯ И ВОСПРОИЗВОДСТВО

УДК 602.6:636.393.082.31:636.082.453.52

Д.М. БОГДАНОВИЧ, Е.В. ПЕТРУШКО

КИНЕМАТИКА ПОДВИЖНОСТИ СПЕРМЫ КОЗЛОВ-ПРОИЗВОДИТЕЛЕЙ, ТРАНСГЕННЫХ ПО ГЕНУ РЕКОМБИНАНТНОГО ЛАКТОФЕРРИНА

*Научно-практический центр Национальной академии наук Беларуси
по животноводству, г. Жодино, Республика Беларусь*

В статье представлены материалы научной работы, целью которой явилось изучение подвижности сперматозоидов нетрансгенных и трансгенных по гену рЛФ самцов-производителей поколения F₄₋₅ с учётом кинематических параметров подвижности спермиев. Исследования показали, что все используемые в опыте козлы-производители характеризуются биологически полноценной спермой с быстроподвижными и прямолинейно-поступательно движущимися половыми гаметами с прогнозируемой высокой оплодотворяющей способностью. Показатели подвижности и кинематики спермиев, как у трансгенных, так и у обычных производителей, имели однотипный уровень значений, а значит присутствие чужеродного гена в организме трансгенных самцов поколения F₄₋₅ не оказывает влияния на их репродуктивные функции.

Ключевые слова: качество сперматозоидов, рекомбинантный лактоферрин, трансгенный козел, эякулят.

D.M. BOGDANOVICH, E.V. PETRUSHKO

KINEMATICS OF SPERM MOTILITY OF BILLY GOATS TRANSGENIC FOR RECOMBINANT LACTOFERRIN GENE

*Scientific and Practical Center of the National Academy of Sciences
of Belarus for Animal Breeding, Zhodino, Republic of Belarus*

The article presents the materials of scientific work, the purpose of which was to study the sperm motility of non-transgenic and rLF gene transgenic males of F₄₋₅ generation, taking into account the kinematic parameters of sperm motility. The studies showed that all the billy goats used in the experiment were characterized by biologically complete sperm with fast-moving and linearly progressive sex gametes with a predicted high fertilizing ability. Indicators of sperm motility and kinematics both in transgenic and in common billy goats had the same level of values, which means

that the presence of a foreign gene in the organism of transgenic males of F4-5 generation does not affect their reproductive functions.

Keywords: sperm quality, recombinant lactoferrin, transgenic goat, ejaculate.

Введение. В 2007 г. в РУП «Научно-практический центр Национальной академии наук Беларуси по животноводству» получили двух трансгенных по гену рекомбинантного лактоферрина козла-основателя, которые явились родоначальниками создания стада коз, продуцирующих в своём молоке рекомбинантный лактоферрин. Животные были получены методом микроинъекции чужеродной конструкции, состоящей из кДНК лактоферрина человека (чЛФ), в пронуклеус зиготы, связанной с промотором бета-казеина коз для направления экспрессии рекомбинантного лактоферрина (рЛФ) в молочную железу [1]. В настоящее время численность трансгенных особей насчитывает 178 голов поколения F_{4.5}.

Лактоферрин (ЛФ) является положительно заряженным антимикробным гликопротеином, присутствующим в выделительных жидкостях человека и животных. В женском молоке отмечается его высокая концентрация, в молоке животных – низкая. По мнению ряда авторов, ЛФ обладает не менее 20 биологическими функциями, среди которых к наиболее значимым относят три основных направления, отражающих активное действие гликопротеина на организм человека: участие в регуляции обмена железа, поддержка здоровья кишечника и иммунной системы [2, 3, 4].

Молочная железа трансгенных коз, полученных в результате осеменения спермой Тг козлов нетрансгенных (нТг) самок, продуцирует молоко с содержанием рЛФ 1,5-3,5 г/л, что в 15-35 раз превышает содержание ЛФ в молоке от обычных коров и коз. Однако количество рЛФ сопоставимо с таковым в молоке лактирующей женщины (чЛФ), где белок содержится в диапазоне 1,0-3,5 г/л. Более того, ввиду проявления схожих физиологических эффектов обоими видами лактоферрина, рЛФ можно считать биологическим аналогом чЛФ [1, 5].

Нами установлено, что присутствие чужеродного гена не оказывает отрицательного влияния, как на само животное, так и на состав молока, вырабатываемого Тг козами. Это подтверждается отсутствием различий в показателях физико-химического и микробиологического состава молока, а также по молочной продуктивности между нТг и Тг самками, которые были установлены на основании ранее проведённых исследований [6, 7].

В настоящее время выделение рЛФ из молока коз-продуцентов осуществляется на технологической линии, принадлежащей РУП «Научно-

практический центр Национальной академии наук Беларуси по животноводству» и функционирующей в г. Минск [8]. Таким образом, создана хорошо организованная технологическая цепочка последовательных действий, направленных на создание стада трансгенных животных и выделение рЛФ из молока коз-продуцентов.

Важным элементом поддержания и развития стада животных-продуцентов целевого белка интереса являются трансгенные самцы-производители, качество спермопродукции которых во многом определяет получение потомства с требуемой продуктивностью. В литературных обзорах имеется информация о репродуктивных нарушениях у трансгенных самцов, причиной которых в большинстве случаев оказывается присутствие чужеродного гена. Так, Pursel V.G. et al. [9], Bartke A. et al. [10], Meliska C.J. et al. [11] приводят данные о снижении фертильности, бесплодии, структурных и функциональных дефектах спермы трансгенных по гену гормона роста человека мышей и свиней. Другими исследователями сообщается о снижении воспроизводительной способности у трансгенных по гену $\alpha 1,2$ -фукозилтрансферазы человека у хряков [12], гену TLR2 у коз [13] и TLR4 у овец [14]. В то же время Chrenek P. et al. [15], Jackson A. et al. [16], Batista R. et al. [17] заявляют об отсутствии различий в качестве сперматозоидов и воспроизводительных способностях трансгенных по гену mWAP-hFVIII кроликов-самцов поколения F₄-F₅, по гену hLZ козлов, трансгенных по гену hG-CSF козлов поколения F₁ в сравнении с неотредактированными особями.

Kathiravan P. et al. [18] считают, что подвижность сперматозоидов является определяющим параметром, влияющим на плодовитость самцов. Дефектная сперма связана со снижением фертильности, развитием эмбриона, а объективную оценку подвижности сперматозоидов можно проводить только с помощью компьютерного анализа, который учитывает многие скоростные параметры спермиев.

В связи с вышеизложенным, целью исследований явилось изучение подвижности сперматозоидов нетрансгенных и трансгенных по гену рЛФ самцов-производителей поколения F_{4.5} с учётом кинематических параметров подвижности спермиев.

Материалы и методика исследований. Исследования проведены в РУП «Научно-практический центр Национальной академии наук Беларуси по животноводству» в октябре-ноябре 2023 г. на трёхлетних козлах-производителях зааненской породы живой массой 55-65 кг (2 нТг козла поколения F₅-F₆ и 2 Тг по гену лактоферрина человека козла (конструкция hLF3) поколения F₄-F₅). Животные были получены путём спаривания трансгенных мужских/женских особей с нетрансгенными женскими/мужскими особями.

Все самцы содержались в индивидуальных клетках с одинаковым рационом кормления и условиями содержания.

Сперму получали (один эякулят на самца в день сбора) два раза в неделю с перерывом 3-4 дня на специальную искусственную вагину производства IMV (Франция). В опыте использовалось 80 эякулятов. Разбавленные образцы хранили при температуре 37 °С. Свежеполученная сперма разбавлялась в соотношении 1/10 раствором на основе глюкозы и цитрата натрия. Микроскопическая оценка по показателю подвижности осуществлялась при 400-кратном увеличении на компьютерном спермоанализаторе Spermvision с использованием программного обеспечения IDEE (Minitube, Германия). Анализ каждого эякулята проводили в трёх повторениях с вычислением средней величины. Оценка спермы проводилась по следующим показателям: прямолинейная подвижность (%), кинематические параметры движения – DAP (среднее расстояние пути, мкм); DCL (изогнутая линия расстояния сперматозоида, мкм); DSL (прямая линия расстояния, мкм); VAP (средняя скорость пути, мкм/с); VCL (криволинейная скорость, мкм/с); VSL (прямолинейная скорость, мкм/с); STR (прямолинейное движение, которое представляет собой соотношение, $STR = VSL/VAP$; %), LIN (линейность движения, представленная соотношением, $LIN = VSL/VCL$, %); WOB (колебательное движение, $WOB = VAP/VCL$, %); ALH (амплитуда колебания головки, мкм); BCF (перекрестная частота биений, Гц).

Полученные данные были обработаны с помощью приложения Microsoft Office Excel.

Результаты эксперимента и их обсуждение. В таблице 1 представлены результаты, полученные при проведении оценки качества семенного материала нТг и Тг козлов-производителей. В опыте использовались эякуляты с минимальной прямолинейно-поступательной подвижностью >70 % (n=34, от нетрансгенных козлов; n=36, от трансгенных козлов). Полученные данные демонстрируют отсутствие достоверных различий в подвижности и скоростных характеристиках сперматозоидов между обеими группами и близкий уровень итоговых значений с небольшим преимуществом в эякулятах нТг животных. Так, разница в подвижности сперматозоидов нТг (90,05 %) и Тг групп (87,77 %) составила 2,3 п/п; в параметрах расстояния DAP, DCL, DSL – 2,5 мкм (11 %), 1,49 мкм (4 %) и 2,11 мкм (14 %) соответственно; в показателях скорости движения сперматозоида VAP, VCL, VSL – 6,82 мкм/сек (13 %), 4,07 (4 %) и 5,31 мкм/сек (14 %) соответственно; в показателях линейности STR, LIN различия были 0,8 и 10 % соответственно; в параметрах движения головки сперматозоида WOB, ALH, BCF – 9 % для всех соответственно.

Таблица 1 – Параметры спермы нетрансгенных (поколения F₅–F₆) и трансгенных по гену рЛФ (поколения F₄–F₅) с общей подвижностью >70%

Показатели	Нетрансгенные козлы (n=34)	Трансгенные козлы (n=36)
Подвижность, %	90,05±0,79	87,77±0,85
DAP, мкм	21,73±0,61	19,23±0,83
DCL, мкм	39,04±0,88	37,55±1,40
DSL, мкм	15,53±0,56	13,42±0,66
VAP, мкм/с	52,61±1,46	45,79±2,08
VCL, мкм/с	93,83±2,03	89,76±3,40
VSL, мкм/с	37,84±1,32	32,53±1,62
STR, %	71,6±0,01	71,04±0,00
LIN, %	40,3±0,01	36,24±0,00
WOB, %	56,6±0,0	51,0±0,00
ALH, мкм	5,22±0,14	4,77±0,19
BCF, Гц	23,42±0,38	21,25±0,62

В литературе накоплены различные представления об оценке подвижности биоматериала самцов. Исследователи Khalifa T.A.A. et al. полагают, что сперма козлов считается хорошей, если она имеет подвижность сперматозоидов более 70 % [19]. Авторы Kirsten H. et al. характеризуют сперматозоиды с VCL <90 мкм/сек как медленноподвижные, а с VCL ≥ 90 как быстроподвижные [20]. Sevilla, F. et al. высказывают мнение, что сперматозоидами хорошего качества считаются сперматозоиды с индексом прямолинейности (STR) не <45 % и средней скоростью пути (VAP) ≥25 мкм/сек [21].

Сопоставив полученные нами результаты (таблица 1) с данными, которые приводят авторы [19], можно сделать вывод, что подвижность спермиев в группах нТг (90,05 %) и Тг (87,77 %) на 22 и 20 % выше в сравнении с указанными результатами, что позволяет говорить о её хорошем качестве.

Сравнением криволинейной скорости спермиев (VCL) нТг (93,83 мкм/сек) и Тг (89,76 мкм/сек) с пороговыми значениями предложенными авторами [20] определяют сперматозоиды нТг и Тг групп как быстроподвижные. В свою очередь, сравнение данных опытных групп с индексами оценки, предложенными исследователями [21], демонстрирует, что VAP в нТг и Тг группах превышает данные автора на 27,61 и 20,79 мкм/сек, а по параметру STR на 26 п/п для обеих групп, что также говорит о хорошем качестве эякулятов самцов.

Таким образом, нетрансгенные и трансгенные производители, принадлежащие РУП «Научно-практический центр Национальной академии наук Беларуси по животноводству», характеризуются

биологически полноценной спермой с быстроподвижными и прямолинейно-поступательно движущимися половыми гаметами с прогнозируемой высокой оплодотворяющей способностью.

Выводы. 1. Сравнительный анализ спермы нетрансгенных и трансгенных по гену рекомбинантного лактоферрина козлов-производителей (поколение F_{4.5}) не выявил достоверных различий в значениях кинематических параметров двигательной активности половых гамет.

2. Показатели подвижности и кинематики спермиев, как у трансгенных, так и у обычных производителей, имели однотипный уровень значений, который демонстрирует, что присутствие чужеродного гена в организме трансгенных самцов поколения F_{4.5} не оказывает влияния на их репродуктивные функции.

Литература

1. Production of human lactoferrin in animal milk / I. L. Goldman [et al.] // *Biochem. Cell Biol.* – 2012. – Vol 90(3). – P. 513–519. DOI: 10.1139/o11-088.
2. Modulation of TDM-induced granuloma pathology by human lactoferrin: A persistent effect in mice / J. K. Actor [et al.] // *Biometals.* – 2023. – Vol. 36. – P. 603–615. DOI: 10.1007/s10534-022-00434-0
3. Lactoferrin a multiple bioactive protein: An overview / I.A. García-Montoya [et al.] // *Biochim Biophys Acta.* – 2012. – Vol. 1820. – P. 226–236. DOI: 10.1016/j.bbagen.2011.06.018.
4. Ward, P. P. Multifunctional roles of lactoferrin: A critical overview / P. P. Ward, E. Paz, O. M. Connelly // *Cell. Mol. Life Sci.* – 2005. – Vol. 62. – P. 2540–2548. DOI: 10.1007/s00018-005-5369-8.
5. Получение рекомбинантного лактоферрина человека из молока коз-производителей и его физиологические эффекты / В. С. Лукашевич [и др.] // Доклады Нац. акад. наук Беларуси. – 2016. – Т. 60, No 1. – С. 72–81.
6. Goats producing biosimilar human lactoferrin / D. M. Bogdanovich [et al.] // *IOP Conf. Ser.: Earth Environ. Sci.* – 2021. – Vol. 852. – 12080. DOI: 10.1088/1755-1315/848/1/012080.
7. Влияние интервального доения коз-производителей на физико-химические показатели и содержание лактоферрина человека в молоке животных / А. И. Будевич [и др.] // Ученые записки УО "ВГАВМ". – 2023. – Т. 59, вып. 2. – С. 93–98. – DOI 10.52368/2078-0109-2023-59-2-93-98.
8. Isolation of a human lactoferrin biosimilar from frozen milk of goat producers / N. I. Mosolova [et al.] // *E3S Web of Conferences : AGRITECH-VIII-2023 : VIII International Conference on Advanced Agritechologies, Environmental Engineering and Sustainable Development, Krasnoyarsk, Russia, March 29-31, 2023.* – Krasnoyarsk, 2023. – Vol. 390. – 02044. DOI 10.1051/e3sconf/202339002044.
9. Expression and performance in transgenic pigs / V. G. Pursel [et al.] // *J. Reprod. Fertil.* – 1990. – Vol. 40. – P. 235–242.
10. Effects of expression of human or bovine growth hormone genes on sperm production and male reproductive performance in four lines of transgenic mice / A. Bartke [et al.] // *J. Reprod. Fertil.* – 1992. – Vol. 95 (1). – P. 109–118. DOI: 10.1530/jrf.0.0950109.
11. Meliska, C. J. Copulatory behavior and fertility in transgenic male mice expressing human placental growth hormone gene / C. J. Meliska, A. Bartke // *J. Androl.* – 1997. – Vol. 18(3). – P. 305–311.
12. Effect of semen quality in transgenic boars on the developmental competence of preimplantation embryos / M. Bryla [et al.] // *Animal Reproduction Science* – 2010. – Vol. 118. – P.

77–82. DOI: 10.1016/j.anireprosci.2009.06.008.

13. Effects of over-expression of TLR2 in transgenic goats on pathogen clearance and role of 386 up-regulation of lysozyme secretion and infiltration of inflammatory cells / S. Deng [et al.] // BMC Vet. Res. – 2012. – Vol. 196. DOI: 10.1186/1746-6148-8-196.

14. Effects of the 389 TLR4 transgene on reproductive traits and DNA methylation pattern of oocytes in ewes / Y. Fang [et al.] // Front. Agr. Sci – 2014. – Vol. 1(4). – P. 314–320. DOI: 10.15302/J-FASE-2014038/

15. Spermatozoa quality of the transgenic rabbit offspring / P. Chrenek [et al.] // Slovak J. Anim. Sci. – 2011. – Vol. 44. – P. 124–128.

16. Evaluating the fitness of human lysozyme transgenic dairy goats: growth and reproductive traits / A. K. Jackson [et al.] // Transgenic Res. – 2010. – Vol. 19(6). – P. 977–986. DOI: 10.1007/s11248-010-9371-z.

17. Growth and reproductive traits of F1-generation transgenic goats for human granulocyte-colony stimulating factor / R. Batista [et al.] // Animal Production Science. – 2018. – Vol. 7. – P. 1218. DOI: 10.1071/AN16582.

18. Objective sperm motion analysis to assess dairy bull fertility using computer-aided system- a review / P. Kathiravan [et al.] // Reprod. Domest. Anim. – 2011. – Vol. 46. – P. 165–172. DOI: 10.1111/j.1439-0531.2010.01603.x.

19. Testing Usability of Butylated Hydroxytoluene in Conservation of Goat Semen / T. A. A. Khalifa [et al.] // Reprod. Domest. Anim. – 2008. – Vol. 43. – P. 525–530. DOI: 10.1111/j.1439-0531.2007.00947.x.

20. Effect of temperature and time after collection on buck sperm quality / H. Kirsten [et al.] // BMC Veterinary Research. – 2019. – Vol. 15. – P. 1-7. DOI: 10.1186/s12917-019-2135-y.

21. Are there differences between methods used for the objective estimation of boar sperm concentration and motility? / F. Seville [et al.] // Animals. – 2023. – Vol. 13. – P. 1622. DOI: 10.3390/ani13101622

Поступила 4.04.2024 г.

УДК 636.4.082.453.52:544.538

Д.М. БОГДАНОВИЧ¹, В.Ю. ПЛАВСКИЙ², А.И. БУДЕВИЧ¹,
Н.В. ЯНУТЬ¹, С.А. САПСАЛЁВ¹

ВЛИЯНИЕ ЛАЗЕРА КРАСНОЙ ОБЛАСТИ СПЕКТРА НА ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ СПЕРМЫ ХРЯКОВ

*¹Научно-практический центр Национальной академии наук Беларуси
по животноводству, г. Жодино, Республика Беларусь*

*²Институт физики Национальной академии наук Беларуси,
г. Минск, Республика Беларусь*

Одним из биобезопасных методов повышения оплодотворяющей способности спермы считается воздействие на половые гаметы оптического излучения низкой интенсивности. Нами изучалось влияние лазерного излучения красной