

А.И. БУДЕВИЧ, В.Г. ЧАРТОРИЙСКИЙ

**ВЛИЯНИЕ НЕКОТОРЫХ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ
ФАКТОРОВ НА ПРИЖИВЛЯЕМОСТЬ И ПОЛУЧЕНИЕ
ПРИПЛОДА У КОЗ-РЕЦИПИЕНТОВ ПОСЛЕ ПЕРЕСАДКИ
МИКРОИНЪЕЦИРОВАННОГО ГЕННОЙ КОНСТРУКЦИЕЙ
ЭМБРИОМАТЕРИАЛА**

РУП «Научно-практический центр Национальной академии наук
Беларуси по животноводству»

Введение. Успешная трансплантация микроинъецированного биоматериала реципиентам является одним из условий, способствующих получению желаемого результата в трансгенной биотехнологии. Пересадка зигот включает несколько этапов, в числе которых гормональная подготовка реципиентов или их выбор в спонтанной охоте является обязательным условием подготовки животных с определением признаков эструса при индуцированной и естественной охоте.

Так, Ebert K. M. et al. [1] была получена 50%-ная приживляемость, установленная ультразвуковым методом на 45-й и 55-й день после хирургической пересадки биоматериала с введённой генной конструкцией у коз, синхронизированных ушными имплантатами с норгестометом (Synhromate-B, 6 мг). На 7-9-й день реципиентам был инъецирован простагландин, а на 13-й – 400-750 IU ГСЖК в зависимости от сезона года. Выявление в охоте животных проводили пробниками. В результате из 29 родившихся козлят было получено 2 (6,9 %) трансгенных потомка по гену тканеспецифичного активатора плазминогена.

По данным других учёных [2, 3], стимуляция-синхронизация цикла реципиентов аналогом простагландина F2α с одновременной инъекцией 400 МЕ ГСЖК в день введения эстуфалана донорам способствовало получению 34,8 % приживляемости «проколотых» зигот и эмбрионов (ультразвуковая диагностика на 40-е сутки после трансплантации), степень интеграции гена составила 12,5 %. Вместе с тем, использование пессариев (губки, пропитанные прогестероном) в течение 13-ти дней и инъекция 400 МЕ ГСЖК за 12 ч до удаления губок привели к беременности 40,0 % животных, однако приплода получено не было.

По данным Freitas V.J.F. et al. [4], применение внутривлагалищных губок, пропитанных 45 мг FGA (Synchro-part, Sanofi, Франция), на 11 дней с инъекцией на 9-й день 50 мкг клопростенола и 200 IU eCG (Synchro-part, Sanofi) позволило идентифицировать эструс у 94,1 % ре-

ципиентов с получением от 2 до 13 овуляций (в среднем 5,3 на реципиента), причём средний интервал времени от конца обработки до проявления признаков охоты был 22 ч. Вместе с тем, авторы указывают на низкий выход приплода (6,3 %) после пересадки клеток с чужеродной ДНК и отсутствие трансгенных потомков.

Важнейшим элементом получения высокой приживляемости микроинъецированных зигот у реципиентов является точность синхронизации половой охоты донора и реципиента. Считается, что максимальное приближение гормонального фона и биохимического статуса животных способствует адекватной реакции организма реципиента на сигнал, исходящий от помещённого в яйцевод эмбриона, с последующими физиологически обусловленными процессами nidации зародыша, нормального развития и течения беременности [4, 5].

В своих исследованиях Armstrong D.T. et al. [6] не получили достоверного результата по приживляемости эмбрионов коз при синхронизации охоты у доноров и реципиентов ± 1 день: 50,0-, 60,0-и 57,2%-ная беременности у реципиентов были диагностированы при эструсе за 1 день, одновременно и в последующий день с донором, соответственно.

Другими исследователями [7] было пересажено 511 микроинъецированных эмбрионов и получен 1,2 % трансгенного потомства овец (6 голов) по генам человека фактору IX свертываемости крови и $\alpha 1$ -атитрипсину, при этом циклы доноров и реципиентов были строго синхронизированы. По данным Baldassare H. et al. [8], асинхронность ± 12 часов эструсов у доноров и реципиентов повлияла на беременность последних (-12=55%, 0=43%, +12=50%). Разница по указанному показателю между группами животных составила 5-12 %.

Гольдман И.Л. и др. [9] и Эрнст Л.К. и др. [10] при получении трансгенных овец предложили использовать конвейерную систему пересадки микроинъецированного чужеродной ДНК биоматериала, предполагающую использование доноров в качестве реципиентов, так как здесь достигается высокая степень синхронности половых циклов и физиологического состояния животных, что позволяет получать от 40 до 56 % суягных овец с частотой рождения трансгенов от числа родившихся трансплантантов 5,7-9,1 %.

Одним из условий проведения трансплантации микроинъецированного биоматериала является наличие хорошо выраженного жёлтого тела яичника реципиента. Присутствие отдельных фолликулов или одновременно фолликулов с жёлтыми телами может быть одним из факторов неудачной пересадки зигот вследствие несоответствия состояния гормонального профиля крови реципиента стадии развития клетки. С целью исключения некоторых причин, обуславливающих снижение результативности по показателю приживляемости, отбор реципиентов

ведут по наличию ярко выраженной охоты и физиологическому состоянию яичников.

Вместе с тем, Baldassare H. et al. [8] не установили достоверных различий зависимости результатов трансплантации от числа жёлтых тел (при 1 жёлтом теле приживляемость зигот составила 50 %, при 2-х – 53 %, при 3-х – 53 %, при 4-х и более – 48 %, соответственно).

В исследованиях Gootwine E. et al. [11] реципиенты были синхронизированы внутривлагалищными прогестероновыми пессариями CIDR (300 мг прогестерона) в течение 19 дней. У 21 %, 26, 17 и 14% реципиентов было обнаружено 1, 2, 3 и 4 жёлтых тела, соответственно, у остальных – до 11-ти. После хирургической пересадки в яйцевод 2-х или 3-х микроинъецированных ДНК-конструкцией и прокультивированных в течение 24 ч эмбрионов беременность была установлена через 35 дней ультразвуком (Scanner 200, PIE Medical, Голландия) частотой 5,0 МГц у 82-х животных (29,0 %).

Freitas V.J.F. et al. [4] у 17-ти реципиентов идентифицировали от 2-х до 13-ти жёлтых тел (в среднем 5,3 на реципиента). После пересадки 16-ти животным микроинъецированных зигот беременность наступила у одного реципиента (6,3 %).

Baldassare H. et al. [12] сообщили, что трансплантация 219 козам-реципиентам созревших и оплодотворенных *in vitro* микроинъецированных чужеродной ДНК 1366 зигот (в среднем 6,2 клетки на реципиента) привела к козлениям 91 самку с рождением 150-ти козлят, из которых 9 (6%) голов (6 самцов и 3 самки) оказались трансгенными. Пересадка осуществлялась реципиентам, имеющим, по крайней мере, 1 жёлтое тело.

В связи с вышеизложенным, целью исследований явилось изучение влияния некоторых биотехнологических факторов на приживляемость и получение приплода у коз-реципиентов после пересадки микроинъецированного генной конструкцией эмбриоматериала.

Материал и методика исследований. Исследования проводились в период 2005-2006 гг. в лаборатории воспроизводства и генной инженерии сельскохозяйственных животных и в Биотехнологическом центре с опытным производством РУП «Научно-практический центр Национальной академии наук Беларуси по животноводству».

В качестве доноров использовались улучшенные местные грубошерстные козы 1-3-й лактации и случного возраста живой массой 35-40 кг.

С целью индукции множественной овуляции донорам (n=22) инъецировался фолликулостимулирующий гормон «Оваген» (Новая Зеландия) в общих дозах 6 и 12 мг по четырёхдневной схеме с применением с первой инъекцией ФСГ ГСЖК (Фоллигон, Голландия) одно-

кратно в дозе 150 IU и с восьмой инъекцией – ФСГ ХГ «Овогест» в дозе 150 I.E. Донорам перед инъекцией ФСГ вводились ушные импланты «Crestar» («Intervet»).

Извлечение эмбрионов осуществлялось хирургически. Для индуцирования наркоза у коз использовался 2%-й раствор ксилы с проведением местной анестезии в область операционного поля (5%-й раствор урсокаина).

Пригодность зигот к микроинъекционированию чужеродной ДНК оценивалась по форме клеток, однородности их цитоплазмы, наличию пронуклеусов и направлятельных телец.

Все микроманипуляции с зиготами осуществлялись под микроскопом «Axiovert 200» с помощью микроманипуляторов «Narishige», микроинъектора «FemtoJet». Микроинструменты изготавливались с помощью пулера «РС-10» и микрокузницы «MF-900».

Стадия двух пронуклеусов зигот определялась на основе ДИК-контраста. В зиготы коз микроинъекцировались следующие генные конструкторы, включающие ген лактоферрина человека:

1. кДНК лактоферрина, клонированная под контролем бета-казеинового промотора коз;
2. кДНК лактоферрина, клонированная под контролем альфа-казеинового промотора коз.

Микроинъекция конструктора производилась путём прокола зоны пеллюцида микроиглой и введением ДНК в один из пронуклеусов. Увеличение пронуклеуса в 1,5-2 раза свидетельствовало об удачно выполненной микроинъекции. Зигота удерживалась микроприсоской. Далее эмбриоматериал помещался в инкубатор для культивирования.

В качестве реципиентов использовались улучшенные местные грубошёрстные козы случного возраста и 1-2 лактации живой массой 35-40 кг. Животным с целью синхронизации охоты вводились ушные импланты «Crestar» («Intervet») с одновременной инъекцией эстрадиола на 9-10 дней с последующим введением СЖК (индуцированный эструс). Козы отбирались и в естественной охоте (спонтанный эструс). Пересадка биоматериала осуществлялась хирургически. Синхронность реципиентов по отношению к донору составляла -12-24 час, 0-8 час и +12-24 час. Учитывалось физиологическое состояние яичников (количество жёлтых тел) реципиентов.

Выявление в охоте животных проводилось вазэктомированными самцами-пробниками, естественная случка – общепринятыми методами. Кормление и содержание животных осуществлялось согласно норм ВАСХНИЛ (1985).

Результаты эксперимента и их обсуждение. Показатели приживаемости и выхода приплода являются одними из основных итогов

проведения исследований в области генной инженерии.

В табл. 1 приведены данные по приживляемости микроинъецированного чужеродной ДНК биоматериала у коз-реципиентов при спонтанной и индуцированной охоте.

Таблица 1

Влияние индуцированного и спонтанного эструса на приживляемость микроинъецированных зигот у коз-реципиентов

Показатели	Половая охота	
	индуцированная	спонтанная
Количество отобранных реципиентов, n-%	47-100,0	23-100
Количество реципиентов, проявивших признаки эструса, n-%	39-83,0	23-100,0
Количество пересадок, n	9	8
Приживляемость, n-%	2-22,2	3-37,5

Из данных таблицы видно, что вызывание эструса у коз позволяет синхронизировать половую охоту у 83,0 % реципиентов. Пересадка микроинъецированных зигот в спонтанную охоту реципиентов способствовала повышению приживляемости на 15,3 %.

Таким образом, выявление животных в естественной охоте и трансплантация им зигот с введённой чужеродной ДНК предпочтительней по сравнению с индуцированным эструсом, однако синхронизация охоты позволяет иметь гарантированное число реципиентов и более эффективно планировать работу по поучению трансгенных животных.

Использование реципиентов с синхронизацией охоты -12-24 ч по отношению к донору не привело к получению результативной пересадки (табл. 2). В то же время синхронное проявление эструса и в интервале +12-24 часа способствовало получению приживляемости у 27,3 и 50,0 % коз, соответственно.

Таблица 2

Влияние точности синхронизации эструса на приживляемость микроинъецированных зигот у реципиентов

Синхронность эструса реципиентов по отношению к донору, час	Количество животных в охоте, n	Количество пересадок, n-%	Приживляемость, n-%
-12-24	12	2-16,7	-
0-8	29	11-37,9	3-27,3
+12-24	21	4-19,0	2-50,0
Всего, n-%	62	17-27,4	5-29,4

В табл. 3 приведены данные по приживляемости микроинъецированного чужеродной ДНК биоматериала у коз-реципиентов в зависимости от количества овуляций.

Таблица 3

Влияние физиологического состояния яичников реципиентов на приживляемость микроинъецированных зигот

Показатели	Спонтанный эструс	Индукцированный эструс	Всего	Приживляемость
Количество овуляций всего, п из них:	15	68	83	-
1 овуляция, гол.-%	3-37,5	2-22,2	5-29,4	1-20,0
2 овуляции, гол.-%	3-37,5	4-44,5	7-41,2	3-42,9
3 овуляции, гол.-%	2-25,0	-	2-11,8	-
более 3-х овуляций, гол.-%	-	3-33,3	3-17,6	1-33,3

Данные таблицы показывают, что наличие 2-х жёлтых тел на яичниках реципиентов способствовало увеличению приживляемости зигот на 22,9 и 9,6 % по сравнению с присутствием 1 овуляции и более 3, соответственно. Увеличение числа жёлтых тел на яичниках реципиентов не способствовало повышению результативности трансплантации микроинъецированных конструкцией ДНК зигот, что, возможно, связано с гормональным дисбалансом организма животных.

Результаты исследований по получению приплода после пересадки микроинъецированных зигот приведены в табл. 4.

Таблица 4

Получение трансгенного потомства при спонтанном и индуцированном эструсе

Показатели	Спонтанный эструс	Индукцированный эструс	Всего
Количество пересадок, гол.-%	8-47,1	9-52,9	17-100
Приживляемость, гол.-%	3-37,5	2-22,2	5-29,4
Количество аборт, гол.-%	1-33,3	-	1-20,0
*Получено приплода, гол.-%,	3-37,5	4-44,4	7-41,2
**из них:			
- живых, гол.-%	3-100,0	2-50,0	5-71,4
в т.ч. трансгенных, гол.-%	-	-	-
- мертворожденных, гол.-%	-	2-50,0	2-28,6
в т.ч. трансгенных, гол.-%	-	1-25,0	1-14,3

* - в расчёте на количество пересадок

** - в расчёте на количество полученного приплода

Из данных таблицы видно, что при индуцированном эструсе приплода получено на 6,9 % больше по сравнению со спонтанным. Вместе с тем показатель сохранности поголовья был вдвое выше при есте-

ственном цикле. Трансгенность установлена у одного мертворожденного козлёнка, что составило 14,3 % от числа родившихся.

Заключение. 1. Не установлено существенных различий по приживляемости микроинъецированного биоматериала коз в спонтанный и индуцированный эструс. Вместе с тем отмечается тенденция роста количества беременностей при пересадке зигот реципиентам, находившимся в естественной охоте.

2. Синхронное проявление эструса в интервалах 0-8 и +12-24 ч способствовало увеличению показателя приживляемости реципиентов после трансплантации клеток, микроинъецированных чужеродной ДНК. Наличие двух жёлтых тел на яичниках реципиентов позволило повысить приживляемость зигот на 22,9 и 9,6 % по сравнению с присутствием одной и более трёх овуляций, соответственно.

3. Индуцирование эструса способствовало увеличению выхода приплода на 6,9 % больше по сравнению со спонтанным циклом реципиентов. Однако сохранность поголовья была в два раза выше при естественной половой охоте коз. Один мертворожденный козлёнок оказался трансгенным (14,3 % от общего числа родившихся), полученный от реципиента с синхронизированным циклом.

Литература

1. Ebert, K. M. Transgenic production of a variant of human tissue-type / K. M. Ebert, J. E. S Schindler // *Theriogenology*. – 1993. – Vol. 93. – P. 121-135.
2. Использование лапароскопии для извлечения и пересадки эмбрионов при получении трансгенных коз / М. И. Прокофьев [и др.] // Доклады Россельхозакадемии. – 1999. – № 3. – С. 30-32.
3. Юткин, Е. В. Получение трансгенных коз и изучение фенотипических показателей у трансгенных овец с геном α_{S1} -казеин-химозина : автореф. дис. ...канд. биол. наук : 03.00.023 / Юткин Е.В. – п. Горки Ленинские, 1999. – 29 с.
4. Birth of normal kids after microinjection of pronuclear embryos in transgenic goat (*Capra Hircus*) production program in Brasil / V. J. F. Freitas [et al.] // *Genet. Mol. Res.* – 2003. – Vol. 2(2). – P. 200-205.
5. Moon, Y. S. Detrimental effects of superovulation / Y. S. Moon, Y. W. Yun, W. A. King // *Semin. Reprod. Endocrinol.* – 1990. – Vol. 8. – P. 232-241.
6. Superovulation treatments and embryo recovery in Angora goats / D. T. Armstrong. [et al.] // *J. Reprod. Fert.* – 1983. – Vol. 67. – P. 403-410.
7. Gene transfer into sheep / J. P. Simons [et al.] // *Biotechnology*. – 1988. – Vol. 6. – P. 179-183.
8. Embryo transfer in a commercial transgenic production program using BELE® goat embryos / H. Baldassare [et al.] // *Theriogenology*. – 1999. – № 51. – P. 415.
9. Получение овец, трансгенных по генной конструкции α_{S1} -казеин/химозин / Л. К. Эрнст [и др.] // Доклады академии наук. – 1995. – Т. 345, №4. – С. 555-558.
10. Прогрессивная биотехнология получения трансгенных овец / И. Л. Гольдман [и др.] // Доклады Россельхозакадемии. – 1992. – № 9-10. – С. 25-30.
11. Gootwine, E. Transgenic animals in agriculture / E. Gootwine, I. Barash, A. Bor // *Theriogenology*. – 1997. – Vol. 48. – P. 485-499.
12. Production of transgenic goats by pronuclear microinjection of in vitro produced zygotes derived from oocytes recovered by laparoscopy / H. Baldassare [et al.] //

УДК 636.2.034:612.02

А.И. ГАНДЖА, Л.Л. ЛЕТКЕВИЧ, И.В. КОСТИКОВА

ПОЛУЧЕНИЕ РАННИХ ЭМБРИОНОВ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА ВНЕ ОРГАНИЗМА НА ОСНОВЕ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МОНОСЛОЯ КУМУЛЮСНЫХ КЛЕТОК

РУП «Научно-практический центр Национальной академии наук Беларуси по животноводству»

Введение. Активное внедрение клеточных репродуктивных технологий в животноводство является приоритетным в экономической политике многих стран мира. Резкое снижение воспроизводительной функции высокопродуктивных молочных коров становится мировой проблемой, решение которой заключается в применении современных достижений биотехнологии репродукции, к которой относится и технология получения преимплантационных эмбрионов из созревших вне организма яйцеклеток. В настоящее время во многих лабораториях мира разработаны системы дозревания ооцитов из яичников убитых на мясокомбинате коров. Однако вне организма получать стабильный результат не представляется возможным в силу ряда причин, основной из которой является разнородность яичников убитых животных [1].

В условиях *in vivo* созревание ооцитов – это кульминация длительного периода их роста и развития в растущем фолликуле и короткий период мейотического созревания при овуляции. Спонтанное мейотическое созревание ооцитов в условиях *in vitro* обуславливается искусственным высвобождением последнего из ингибиторной среды фолликула [2, 3].

Более того, при созревании *in vivo* структурные элементы фолликулов обеспечивают многообразие биохимических и морфологических изменений, результатом которых является нормальное развитие и рост яйцеклеток, их дальнейшее оплодотворение и развитие. Моделирование условий созревания ооцитов коров на основе использования монослойных культур соматических клеток фолликула подразумевает, прежде всего, разработку оптимального состава сред, обеспечивающих полноценное созревание ооцитов и их развитие в эмбрионы после оплодотворения.

В частности, к соматическим клеткам относятся клетки кумулюса, играющие большую роль в обменных процессах ооцита, а также, бла-