

ДОСТИЖЕНИЯ, ПРОБЛЕМЫ И ПЕРСПЕКТИВЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ КЛЕТОЧНЫХ ТЕХНОЛОГИЙ В РЕПРОДУКЦИИ ЖИВОТНЫХ

Т.И. КУЗЬМИНА

*Всероссийский научно-исследовательский институт
генетики и разведения сельскохозяйственных животных,
г. Санкт-Петербург-Пушкин, Россия, prof.kouzmina@mail.ru*

Генетическое совершенствование животных, увеличение числа высокопродуктивных особей, бесплодие и ксенотрансплантация органов, сохранение генетических ресурсов млекопитающих, в том числе и исчезающих видов, производство медицинских препаратов - вот лишь основной список проблем, решение которых зависит от эффективности внедрения вспомогательных клеточных репродуктивных технологий в практику. К клеточным технологиям репродукции относятся:

- искусственное осеменение;
- получение эмбрионов *in vivo* (суперовуляция);
- трансплантация эмбрионов;
- криоконсервация ооцитов и эмбрионов;
- получение эмбрионов *in-vitro* (созревание ооцитов, оплодотворение, культивирование эмбрионов);
- клонирование (деление эмбрионов, перенос бластомеров в оболочки ооцитов-доноров, соматическое клонирование, партеногенез);
- трансгенез;
- определение пола эмбрионов;
- сортирование спермы.

Перечисленные биотехнологии находятся на разных уровнях внедрения в практику. Искусственное осеменение – первое грандиозное достижение репродуктивной биологии в воспроизводстве, генетике и селекции сельскохозяйственных животных, особенно у крупного рогатого скота. Технология искусственного осеменения, ставшая уже рутинной, существующая более 50 лет, позволяет моделировать схемы разведения, а также осуществлять контроль венерических заболеваний у животных. В настоящее время успешно развивается биотехнология сортирования спермы по полу, с последующим осеменением и получением потомства заданного пола. В основе метода лежит различие содержания ДНК в X и Y хромосомах. X-содержащие сперматозоиды животных содержат на 4–5% больше ДНК, чем Y-содержащие (у коров на 3,8%). С помощью проточной скоростной лазерной цитофлуориметрии выделяют фракции, содержащие до 95% половых клеток с X или Y хромосомой. Эффективность сортировки составляет в среднем 3000 X и 3000 Y сперматозоидов (в сумме 6000) в секунду, т.е. 10 миллионов в час. Первое коммерческое применение сортированной спермы в животноводстве началось в 2000 году – к настоящему времени получены сотни тысяч животных [1]. Оплодотворяемость телок сортированной спермой при однократном осеменении достигает 40%, а выход потомства желаемого пола составляет 90% [2]. Потомство при использовании сортированного семени получено, кроме крупного рогатого скота, у свиней, овец, лошадей, кроликов, человека. При осеменении коров сортированной нативной или замороженной спермой не обнаружено достоверной разницы в количестве стельных животных [3]. Число трансферрабельных эмбрионов, полученных при осеменении сортированной спермой, не имеет достоверных отличий от числа эмбрионов, полученных при использовании неразделенной спермы [4]. Н. Науакава и др. свидетельствуют о целесообразности применения технологии сортирования семени в программах по разведению крупного рогатого скота голштинской породы на основе индуцированной суперовуляции, искусственного осеменения и трансплантации эмбрионов [5]. Несомненна перспективность использования сортированного семени в практике животноводства при дальнейшей доработке технологических аспектов метода, параллельно с решением фундаментальных вопросов механизмов предетерминации пола в женских гаметах.

В настоящее время коммерциализация достижений клеточных вспомогательных репродуктивных технологий в животноводстве развивается по двум направлениям: получение высокопродуктивных особей для производства высококачественной продукции и разведение животных для

биомедицинских целей. Снижение фертильности высокопродуктивных коров – актуальная проблема современного скотоводства, которая решается с привлечением вспомогательных репродуктивных технологий и, прежде всего, трансплантации эмбрионов. Генетический прогресс значительно расширился благодаря эмбриотрансплантациям. За последние 30 лет пересадка эмбрионов крупного рогатого скота стала неотъемлемой частью селекционных программ по разведению высокопродуктивных животных и в настоящее время является хорошо развитой международной индустрией. Каждый год в мире в результате индуцированной суперовуляции и искусственного осеменения вымывается более полумиллиона эмбрионов коров. Подвергнутые биотестированию и морфологической оценке тысячи эмбрионов продаются во все страны мира. Первая пересадка эмбрионов у животных (кролик) была произведена в 1890 г. Уолтером Хипом [6]. И лишь в 1951 г. хирургическая трансплантация эмбриона коровы завершилась успешным рождением теленка [7]. В 70-е годы прошлого века, вплоть до 80-ых годов пересадки осуществляли в основном хирургически. В настоящее время повсеместно внедрена нехирургическая пересадка зародышей. С 1982 г. сформировались крупнейшие ассоциации по трансплантации эмбрионов в США, Канаде, Европе (АЕТА, СЕТА, АЕТЕ). После разработки методов криоконсервации эмбрионов (медленное замораживание или витрификация) коммерциализация технологии трансплантации эмбрионов значительно интенсифицировалась. В настоящее время с использованием информационных технологий осуществляется мониторинг имеющихся в криобанках эмбрионов, проводится их диагностика, включая микробиологические исследования, а также генотипирование с помощью ПЦР-анализа, позволяющего определять пол эмбриона и содержание белков, например, к-казеина в бластомерах, полученных в результате биопсии зародышей на стадии бластоцисты. Следующим шагом в развитии эмбриотехнологий явилась разработка метода получения эмбрионов из ооцитов, созревших вне (*in vitro*) или в организме животного (*in vivo*). В 1978 г. в результате экстракорпорального оплодотворения родилась девочка, первые телята из ооцитов, созревших и оплодотворенных вне организма, были получены в 80-х годах прошлого столетия [8, 9]. Возможность использования в качестве источника ооцитов яичников убитых животных позволила значительно увеличить число эмбриотрансплантаций, интенсифицировать научные исследования в области клонирования, трансгенеза, получения эмбриональных стволовых клеток [10, 11]. Этапы технологии получения эмбрионов *in vitro* и основные направления использования донорских ооцитов животных представлены на рис. 1. Следует отдельно отметить разработку метода интрацитоплазматического оплодотворения (ICSI), позволившего значительно продвинуться в решении проблем мужского бесплодия. Для получения эмбрионов *in vitro* используют также ооциты, аспирированные из фолликулов яичников живых животных (Ovum Pick Up – OPU-технология). При этом донорами яичников могут служить как половозрелые, так и неполовозрелые особи, при этом число полученных эмбрионов коров на сессию вымываний составляет в среднем 4,7, выход бластоцист достигает 48% [12, 13].

В результате фундаментальных исследований, проведенных в области биологии развития, в том числе изучение механизмов фолликулогенеза, раннего эмбрионального развития, эмбриотехнологиями разработаны системы дозревания донорских яйцеклеток человека, сельскохозяйственных животных (коровы, свиньи и т.д.), их оплодотворения, криоконсервации, культивирования эмбрионов, методы получения соматических клеток для использования их ядер при клонировании животных. Для интенсификации технологий клонирования, трансгенеза предложены комплексные метаболические экспресс-тесты качества донорских яйцеклеток с учетом: морфологической оценки ооцит-кумуляусного комплекса, состояния хроматина, активности митохондрий и их интрацитоплазматической локализации (митохондриальный тест), уровня содержания кальция во внутриклеточных депо ооцитов и эмбрионов сельскохозяйственных животных, уровня апоптозов в овариальных клетках [14, 15].

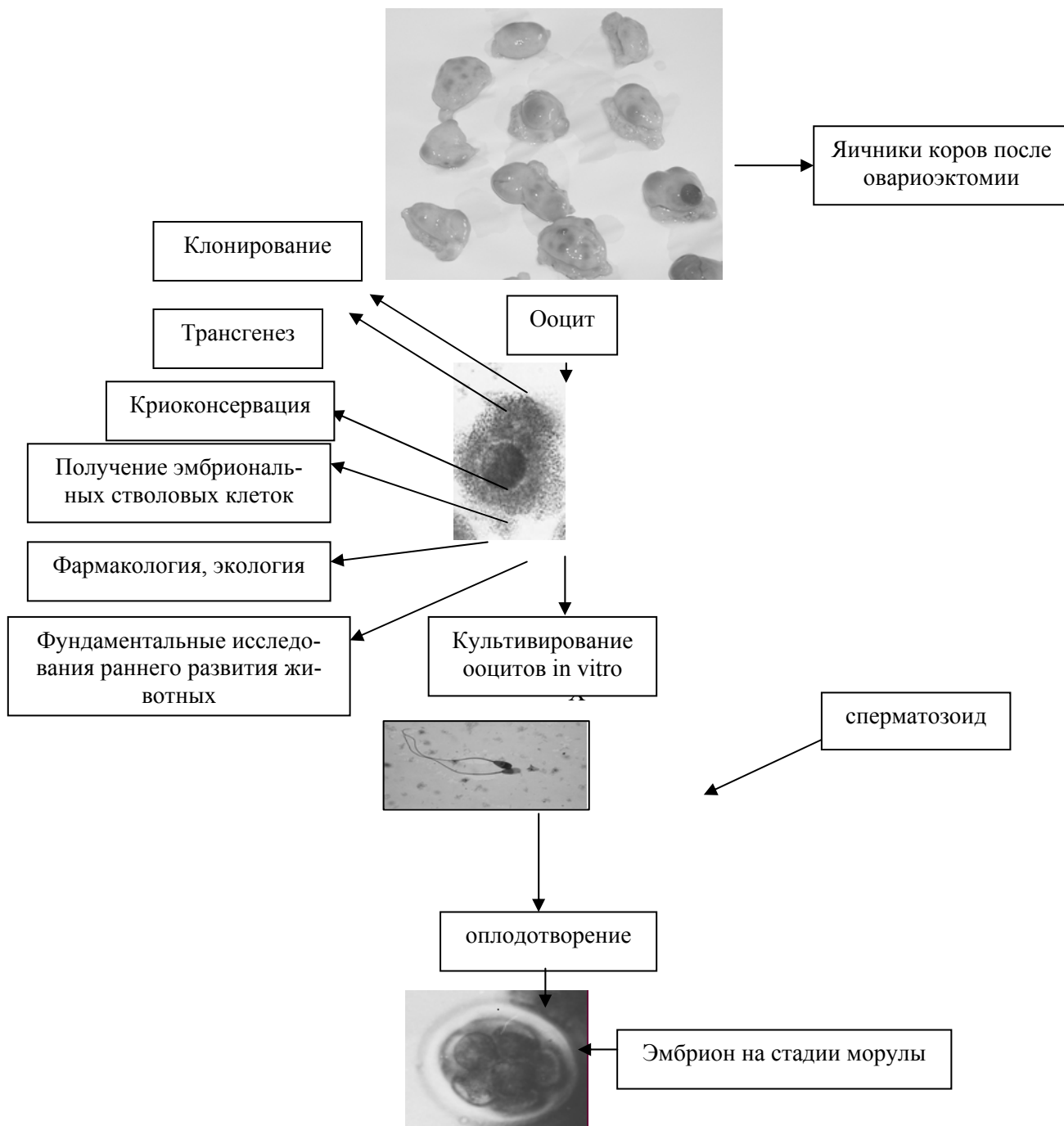


Рис. Этапы технологии получения эмбрионов *in vitro* и основные направления использования донорских ооцитов животных

В последние годы продовольственная сельскохозяйственная организация ООН (FAO) активно ведет работы по созданию глобальной программы для мониторинга и управления генетическими ресурсами животных, в которой важное значение имеет криоконсервация гамет и эмбрионов. Клеточные репродуктивные технологии играют огромную роль не только в решении задач получения высокопродуктивных животных для хозяйственных и биомедицинских целей, но и в сохранении генетических ресурсов (криоконсервация ооцитов, эмбрионов) одомашненных и исчезающих видов диких животных. Существует несколько методов замораживания ооцитов, в том числе криоконсервация репродуктивных органов (яичника или сегментов яичника), фолликулов и ооцитов. За последние десять лет наметился прогресс в технологии замораживания. Так, разработка метода витрификации яйцеклеток позволила получить потомство у коров, свиней, мышей, человека [18–23]. Более того, были получены клонированные телята при использовании в качестве цитопласта

замороженного ооцита [24]. Многообещающие результаты по криоконсервации яичника овец, проведенные Арейвом и др., открывают перспективы использования этого метода в клинической медицине. Авторы показали возможность функционирования овечьего яичника (включая овуляцию яйцеклеток) после овариоэктомии и замораживания с последующей разморозкой и трансплантации овце-донору [25].

Клонирование и трансгенез–эмбриотехнологии, успешное внедрение которых может революционизировать селекционный процесс в животноводстве. Эффективность трансгенеза и клонирования в настоящее время находятся на невысоком уровне, в связи со сложностью проблемы. Для получения трансгенных животных необходимо большое количество донорских ооцитов. Так, в результате использования 11000 ооцитов коров получают 1000 (9%) эмбрионов для трансплантации и только 7(0,7%) из них приживаются и дают полноценное потомство. Несмотря на трудности технологий клонирования и трансгенеза, ведутся активные исследования для их интенсификации. В случае совершенствования методов трансгенеза и клонирования создается возможность конструирования генотипов животных, согласно селекционным задачам. Основываясь на достижениях фундаментальных исследований, к середине 1990-ых годов в США и ряде Европейских стран было организовано биотехцентры, предметом деятельности которых явились биотехнологии получения эмбрионов *in vitro*, трансплантации, определения пола, разделения спермы по полу, получения идентичных животных путем клонирования, в том числе соматического., трансгенез. Особый всплеск получили эти исследования после опубликования группой Вилмута данных о рождении первого клонированного животного из яйцеклетки, реконструированной путем введения в нее ядра соматической клетки взрослой овцы [26]. Возможность соматического клонирования позволила сделать ряд важных выводов о способности репрограммирования ядра соматических клеток взрослых животных. Сейчас клонированные животные получены у многих видов (крупный рогатый скот, козы, овцы, мыши, собаки, кролики, кошки). В качестве источника донорских ядер могут быть служить клетки разных органов. Так, у коров были использованы для этих целей клетки фетальных фибробластов, клетки яйцевода, кумулюса, фибробластов кожи, мышечные клетки [27]. Однако вскоре было показано, что такие животные имеют низкую жизнеспособность и целый ряд патологических изменений, граничащих с жизнью. Необходимы дальнейшие исследования для совершенствования отдельных этапов многоступенчатой технологии клонирования, в том числе экстракорпорального дозревания ооцитов, репрограммирования ядра и т.д.[28–31]. Усилия исследователей в настоящее время направлены на получение трансгенных клонированных животных с высокими продуктивными качествами, продуцирующих в молоко или мочу различные белки и биологически активные вещества, использующиеся в фармакологии и медицине. Активно развиваются исследования по применению эмбриональных стволовых клеток в медицине. Интенсифицируются работы по выращиванию тканей и органов животных (свиней) для ксенотрансплантации. Исследователь, владея современными методами, может, сконструировать любой организм. Так, используя донорские яйцеклетки коров, китайские ученые инъецировали ядра соматических клеток человека, получив межвидовой эмбрион. Американская биотехнологическая компания АСТ ("Advanced cell technology") известна достижениями в трансгенезе и клонировании млекопитающих. Сотрудникам АСТ удалось клонировать крупный рогатый скот, лошадей, свиней, в том числе получить животных с пересаженными «чужими» генами и клонировать представителя одного из исчезающих видов – гаура [32]. Второе направление деятельности АСТ – терапевтическое клонирование у человека [33, 34]. Исследователями биотехцентра разрабатывается технология получения в культуре (т.е. в условиях *in vitro*) стволовых клеток, способных делиться, дифференцироваться в разные клеточные типы, и которые могли бы использоваться для "ремонта" пораженных органов. Среди них, в первую очередь, называются поджелудочная железа, спинной мозг и головной мозг. Использование стволовых клеток может быть очень широким.

Применительно ко многим видам домашних животных уже достаточно хорошо отработаны методы клонирования и трансгенеза [35]. В основном таких особей создают с целью получения в больших количествах белков, имеющих применение в медицине. Реализуются и другие проекты. Так, человеческие гены пересаживаются свиньям в попытках получить животных, чьи органы не будут отторгаться при пересадке человеку и таким образом служить "биопротезами". Возможности генетической инженерии млекопитающих огромны [36]. Лабораторные и домашние животные служат прекрасной моделью для разработки и совершенствования вспомогательных репродуктивных технологий у человека. В 2001 г. было опубликовано сообщение о получении первой транс-

генной обезьяны (до этого подобные эксперименты проводились на более далеких от человека видах животных) [37]. В настоящий момент широко проводятся исследования, связанные с возможностью конструирования новых генотипов крупного рогатого скота путем манипуляций с ранними зародышами, созданием химерных и трансгенных эмбрионов, позволяющих создавать уникальные особи, обладающих высокой продуктивностью, устойчивостью к стрессам и заболеваниям всего за одно поколение. Одно из важнейших достижений клеточных биотехнологий репродукции в молочном животноводстве – рождение 5 трансгенных коров, резистентных к маститу [38]. Сегодня набирает обороты «хромосомная» инженерия, когда исследователи оперируют не отдельными генами, а замещают целые хромосомы. Так, Робл и др. получили телят с искусственными хромосомами человека в геноме, продуцирующими человеческие поликлональные антитела [39]. Получение трансгенных животных, а затем их клонирование позволит решить ряд важных проблем, связанных с ростом мясной и молочной продуктивности, улучшением качества молока, резистентностью к различным заболеваниям [40–43]. Коммерциализация технологий соматического клонирования и трансгенеза тормозится в силу ряда причин связанных с низкой эффективностью клонирования (выход клонированных эмбрионов не выше 4–5%), низкой стельностью, высоким процентом абортос и низкой жизнеспособностью потомства.

Для интенсификации технологий трансгенеза, клонирования, криоконсервации ооцитов необходимо дальнейшее углубленное изучение фундаментальных аспектов биологии развития с привлечением цитологических, биохимических, молекулярно–генетических методов. Среди фундаментальных проблем, решение которых будет способствовать совершенствованию и внедрению клеточных технологий репродукции в практику медицины и животноводство, следует отметить: селекцию доминантного фолликула (механизмы гормональной регуляции мейоза); роль материнской наследственности в формировании зрелой яйцеклетки; прогнозирование оплодотворяющей способности сперматозоидов; репрограммирование хроматина; взаимодействие генов в развитии; межклеточные взаимодействия; регуляторные и сигнальные системы; криорезистентность репродуктивных клеток.

ЛИТЕРАТУРА

1. Seidel, G.E. Overview of sexing sperm/ G.E. Seidel // *Theriogenology*. – 2007. – Vol. 68, Iss. 3. – P. 443–446.
2. Fertility in heifer and cows after low dose insemination with sex-sorted and non-sorted sperm under field conditions / M. Bodmer et. al. // *Theriogenology*. – 2005. – Vol. 64. – P. 1647–1655.
3. Seidel, G.E. Pregnancy rates in cattle with cryopreserved sexed sperm: Effects of sperm numbers per inseminate and site of sperm deposition / G.E. Seidel, J.L. Schenk // *Animal Reproduction Science*. – 2008. – Vol. 105, Iss. 1–2. – P. 129–138.
4. Schenk, J.L. Embryo production from superovulated cattle following insemination of sexed sperm / J.L. Schenk, T.K. Suh, C.E. Seidel // *Theriogenology*. – 2006. – Vol. 65, Iss. 2. – P. 299–307.
5. Hayakawa, H. Aoyagi Superovulation and embryo transfer in Holstein cattle using sexed sperm / H. Hayakawa, T. Hirai, A. Takimoto, A. Ideta // *Theriogenology*. – 2009. – Vol. 71, Iss. 1. – P. 68–73.
6. Hasler, J.F. The current status and future of commercial embryo transfer in cattle / J.F. Hasler // *Anim. Reprod. Sci.* – 2003. – Nr. 79 (3-4). – P. 245–264.
7. Willett, E.L. Three Successful Transplantations of Fertilized Bovine Eggs / E.L. Willett, P.J. Buckner and G.L. Larson // *Journal of Dairy Science*. – 1953. – Vol. 36. – P. 520–523.
8. Эрнст, Л.К. / Л.К. Эрнст // *Вестник сельскохозяйственной науки ВАСХНИЛ*. – 1983. – №7. – С. 77–86.
9. Birth of twins after transfer of cattle embryos produced by in vitro techniques / K.H. Lu et. al. // *Vet Rec.* – 1988. – Vol. 122. – P. 539–540.
10. Niemann, H. Application of transgenesis in livestock for agriculture and biomedicine / H. Niemann, W.A. Kues // *Anim. Reprod. Sci.* – 2003. – Nr. 79 (3-4). – P. 291–317.
11. Кузьмина, Т.И. Созревание яйцеклетки млекопитающих–базовый метод клеточных репродуктивных технологий: мат. 6 Международной конференции «Современные достижения и проблемы биотехнологии сельскохозяйственных животных» / Т.И. Кузьмина. – М., 2006. – С. 108–114.
12. Bousquet, D. In vitro embryo production in the cow: an effective alternative to the conventional embryo production approach / D. Bousquet // *Theriogenology*. – 1999. – Nr. 51 (1). – P. 59–70.
13. Kuzmina T. Effect of the donor's age on bovine oocyte maturation and early embryonic development in vitro / T. Kuzmina H. Torner, H. Alm, W. Kanitz // *Book of abstracts of the 54 Annual Meeting of the European Association for Animal Production*. – Rome, 2003. – Nr. 9. – P. 225.
14. Kuzmina, T.I. Effect of recombinant bovine somatotropin (rbST) on cytoplasmic maturation of bovine oocytes and their developmental competence in vitro / T.I. Kuzmina // *Reprod Develop.* – 2007. – Nr. 53 (2). – P. 309–316.
15. Методы оценки функционального состояния донорских ооцитов, соматических клеток фолликулов и эмбрионов сельскохозяйственных животных: Методические рекомендации / Т.И. Кузьмина [и др.]. – М., 2005. – 32 с.
16. Gray, K.R. The commercial application of embryo splitting in beef cattle / K.R. Gray, K.R. Bondioli, C.L. Betts // *Theriogenology*. – 1991. – Nr. 35 (1). – P. 37–44.

17. Willadsen, S.M. Nuclear transplantation in sheep embryos / S.M. Willadsen // *Nature*. – 1986. – Nr. 320 (6057). – P. 63–65.
18. Development of ovitrified matured cattle oocytes after thawing and culture in vitro / Le Gal et. al. // *Vet. Rec.* – 2000. – Nr. 146. P. 469–471.
19. Fukuda, Y. Birth of normal calves resulting from bovine oocytes matured, fertilized and cultured with cumulus cells in vitro up to the blastocyst stage / Y. Fukuda, M. Ichidawa, K. Naito, Y. Toyoda // *Biol. Reprod.* – 1990. – Nr. 42. – P. 114–119.
20. Birth of piglets from frozen embryos / S. Hayashi et. al. // *Vet. Rec.* – 1989. – Nr. 125. – P. 43–44.
21. Kono, T. Development of vitrified mouse oocytes after IVF / T. Kono // *Cryobiology*. – 1991. – Nr. 28. – P. 50–54.
22. Parkening, T.A. Effects of various low temperatures, cryoprotective agents and cooling rates on the survival, fertilizability and development of frozen-thawed mouse eggs / T.A. Parkening, Y. Tsunoda and M.C. Chang // *J. Exp. Zool.* – 1976. – Nr. 197. – P. 369–374.
23. Chen, C. Pregnancies after human oocyte cryopreservation / C. Chen // *Ann. N.Y. Acad. Sci.* – 1988. – Nr. 541. – P. 541–549.
24. Luster, S.M. A Thesis Cryopreservation of bovine and caprine oocytes by vitrification / S.M. Luster. – 2004. – 83 p.
25. Arav, A. Oocyte recovery, embryo development and ovarian function after cryopreservation and transplantation of whole sheep ovary / A. Arav, A. Uri and A. Elami // *Human Reproduction*, 2005. – P. 1–6.
26. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells / A. Wilmut et. al. // *Nature*. – 2001. – Nr. 385. – P. 810–813.
27. Hasler, J.F. The current status and future of commercial embryo transfer in cattle // J.F. Hasler // *Anim. Reprod. Sci.* – 2003. – Nr. 79 (3-4). – P. 245–264.
28. Kruip, T.A.M. *In vitro* produced and cloned embryos: effects on pregnancy, parturition and offspring / T.A.M. Kruip & J.H.G. den Daas // *Theriogenology*. – 1997. – Nr.47 (1). – P. 43–52.
29. Young, L.E. Large offspring syndrome in cattle and sheep / L.E. Young, K.D. Sinclair & I. Wilmut // *Rev. Reprod.* – 1998. – Nr. 3 (3). – P. 155–163.
30. Farin, P.W. Estimates of pregnancy outcomes based on selection of bovine embryos produced *in vivo* or *in vitro* / P.W. Farin // *Theriogenology*. – 1999. – Nr. 52 (4). – P. 659–670.
31. Effects of different reproduction techniques: AI, MOET or IVP, on health and welfare of bovine offspring / A.M. Wagendonk-de Leeuw et. al. // *Theriogenology*. – 2000. – Nr. 53 (2). – P. 575–597.
32. Lanza, R.P. Cloning Noah's Arc-biotechnology might offer the best way to keep some en-dangered species disappearing from the planet / R.P. Lanza, B.L. Dresser, P. Damiani // *Sci. American*. – 2000. – Vol. 283. – P. 84–89.
33. Lanza, R.P. Human therapeutic cloning / R.P. Lanza, J.B. Cibelli, M.D. West // *Nature Med.* – 1999. – Vol.. 5. – P. 975–977.
34. Lanza, R.P. Prospects for the use of nuclear transfer in human transplantation / R.P. Lanza,, J.B Cibelli., M.D West // *Nature Bio-technol.* – 1999. – Vol. 17. – P. 1171–1174.
35. Di Berardino, M.A. Animal cloning - the route to new genomics in agriculture and medicine / M.A. Di Berardino // *Differentiation*. – 2001. – Vol. 68. – P. 67–83.
36. Moore, H. The modern-day island of Dr. Moreau / H. Moore // *Impact Press*. – 2001. – Nr. 35. – P. 1–8.
37. Transgenic monkeys produced by retroviral gene transfer into mature oocytes / A.W. Chan et. al. // *Science*. – 2001. – Vol. 291. – P. 309–312.
38. Wall, R.J. Transgenic livestock: progress and prospects for the future / R.J. Wall // *Theriogenology*. – 1996. – Nr. 45 (1). – P. 57–68.
39. Robl, J.M. Artificial chromosome vectors and expression of complex proteins in transgenic animals./ J.M.Robl // *Theriogenology*. – 2003. – Nr. 59 (1). – P. 107–113.
40. Brink, M.F. Developing efficient strategies for the generation of transgenic cattle which produce biopharmaceuticals in milk / M.F. Brink, M.D. Bishop & F.R Pieper // *Theriogenology*. – 2000. – Nr. 72. – P. 127–135.
41. Niemann, H. Application of transgenesis in livestock for agriculture and biomedicine / H. Niemann, W.A Kues // *Anim. Reprod. Sci.* – 2003.– Nr. 79 (3-4). – P. 291–317.
42. Stice, S.L. Cloning: new breakthroughs leading to commercial opportunities./ S.L Stice // *Theriogenology*. – 1998. – Nr. 49 (1). P. 129–138.
43. Wall, R. Genetically enhanced cows resist intramammary staphylococcus aureus infection / R Wall // *Nature Biotechnol.* – 2005. – Nr. 23(4). – P. 445–451.

ACHIEVEMENTS, PROBLEMS AND PERSPECTIVES OF CELL TECHNOLOGIES IN REPRODUCTION OF ANIMALS

T.I. KUZMINA

Summary

In this article we present the basic stages of development, improvement and practice application of cell's reproductive technologies from artificial insemination to cloning and transgenesis. We analyze the problems and prognoses the perspectives of commercialization of reproductive biotechnologies in medicine and animal industries

Поступила в редакцию 21 мая 2009 г.