

ERNST JOURNAL OF ANIMAL SCIENCE

УСПЕХИ НАУК О ЖИВОТНЫХ

№1
2025г.



ISSN: 3034-493X

УСПЕХИ НАУК О ЖИВОТНЫХ

Сетевое научное издание

№1
2025г.

УЧРЕДИТЕЛЬ

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение
«Федеральный исследовательский центр животноводства — ВИЖ им. Л.К. Эрнста»

ГЛАВНЫЙ РЕДАКТОР

Зиновьева Н.А. — доктор биологических наук, профессор, академик РАН,
директор ФГБНУ ФИЦ ВИЖ им. Л.К. Эрнста

РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ

Багиров В.А. — доктор биологических наук, член-корреспондент РАН, директор Департамента координации
деятельности организаций в сфере сельскохозяйственных наук Министерства науки и высшего образования РФ

Донник И.М. — доктор биологических наук, профессор, академик РАН, помощник президента ФГБУ НИЦ «Курчатовский институт»

Калашников В.В. — доктор сельскохозяйственных наук, профессор, академик РАН, научный руководитель ФГБНУ «ВНИИ коневодства»

Кузьмина Т. И. — доктор биологических наук, профессор, главный научный сотрудник ВНИИГРЖ — филиала ФГБНУ ФИЦ ВИЖ им. Л.К. Эрнста

РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ

Заместитель главного редактора

Осадчая О.Ю. — кандидат сельскохозяйственных наук, заместитель директора по научно-организационной работе
и работе с филиалами ФГБНУ ФИЦ ВИЖ им. Л.К. Эрнста

Абдельманова А.С. — доктор биологических наук,
заведующая лабораторией ФГБНУ ФИЦ ВИЖ им. Л.К. Эрнста

Боголюбова Н.В. — доктор биологических наук, заведующая
отделом ФГБНУ ФИЦ ВИЖ им. Л.К. Эрнста

Волкова Н.А. — доктор биологических наук, профессор РАН,
заведующая лабораторией ФГБНУ ФИЦ ВИЖ им. Л.К. Эрнста

Гладырь Е.А. — кандидат биологических наук, заведующая
лабораторией ФГБНУ ФИЦ ВИЖ им. Л.К. Эрнста

Двалишвили В.Г. — доктор сельскохозяйственных наук,
главный научный сотрудник ФГБНУ ФИЦ ВИЖ им. Л.К. Эрнста

Денискова Т.Е. — кандидат биологических наук, ведущий
научный сотрудник ФГБНУ ФИЦ ВИЖ им. Л.К. Эрнста

Лебедева И.Ю. — доктор биологических наук, заведующая
лабораторией ФГБНУ ФИЦ ВИЖ им. Л.К. Эрнста

Некрасов Р.В. — доктор сельскохозяйственных наук,
профессор РАН, заведующий отделом ФГБНУ ФИЦ ВИЖ
им. Л.К. Эрнста

Остренко К.С. — доктор биологических наук, заведующий
лабораторией ВНИИФБиП — филиала ФГБНУ ФИЦ ВИЖ
им. Л.К. Эрнста

Пальянов А.А. — кандидат технических наук, заведующий
аспирантурой ФГБНУ ФИЦ ВИЖ им. Л.К. Эрнста

Сермягин А.А. — кандидат сельскохозяйственных наук,
директор ВНИИГРЖ — филиала ФГБНУ ФИЦ ВИЖ
им. Л.К. Эрнста

Сивкин Н.В. — кандидат сельскохозяйственных наук,
учёный секретарь ФГБНУ ФИЦ ВИЖ им. Л.К. Эрнста

Сингина Г.Н. — кандидат биологических наук, заведующая
лабораторией ФГБНУ ФИЦ ВИЖ им. Л.К. Эрнста

Выпускающий редактор

Ершова А.И. — начальник отдела информационной политики
и международного сотрудничества ФГБНУ ФИЦ ВИЖ
им. Л.К. Эрнста

ERNST JOURNAL OF ANIMAL SCIENCE

Online scientific journal

№1
2025

FOUNDER

Federal State Budgetary Scientific Institution
«Federal Research Center for Animal Husbandry named after Academy Member L.K. Ernst»

EDITOR-IN-CHIEF

Natalia A. Zinovieva — Doctor of Biological Sciences, Professor, Member of the RAS,
Director, L.K. Ernst Federal Research Center for Animal Husbandry

EDITORIAL COUNCIL

Vugar A. Bagirov, Doctor of Biological Sciences, Corresponding member of the RAS, Director of the Department
for Coordination of Organizations in the Field of Agricultural Sciences, Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation

Irina M. Donnik, Doctor of Biological Sciences, Professor, Member of the RAS, Assistant to the President, the National Research Centre
Kurchatov Institute

Valery V. Kalashnikov, Doctor of Agricultural Sciences, Professor, Member of the RAS, Scientific Director, All-Russian Research Institution
for Horse Breeding

Tatiana I. Kuzmina, Doctor of Biological Sciences, Professor, Chief Researcher, L.K. Ernst Federal Research Center for Animal Husbandry

EDITORIAL BOARD

Deputy Editor

Olga Yu. Osadchaya, Candidate of Agricultural Sciences, deputy director, L.K. Ernst Federal Research Center for Animal Husbandry

Alexandra S. Abdelmanova, Doctor of Biological Sciences,
laboratory head, L.K. Ernst Federal Research Center for Animal
Husbandry

Nadezhda V. Bogolyubova, Doctor of Biological Sciences,
department head, L.K. Ernst Federal Research Center for Animal
Husbandry

Natalia A. Volkova, Doctor of Biological Sciences, RAS Professor,
department head, L.K. Ernst Federal Research Center for Animal
Husbandry

Elena A. Gladyr, Candidate of Biological Sciences, laboratory
head,
L.K. Ernst Federal Research Center for Animal Husbandry

Vladimir G. Dvalishvili, Doctor of Agricultural Sciences, chief
researcher,
L.K. Ernst Federal Research Center for Animal Husbandry

Tatiana E. Deniskova, Candidate of Biological Sciences, leading
researcher, L.K. Ernst Federal Research Center for Animal
Husbandry

Irina Yu. Lebedeva Doctor of Biological Sciences, laboratory head,
L.K. Ernst Federal Research Center for Animal Husbandry

Roman V. Nekrasov, Doctor of Agricultural Sciences, RAS Professor,
department head, L.K. Ernst Federal Research Center for Animal
Husbandry

Konstantin S. Ostrenko, Doctor of Biological Sciences, laboratory
head, L.K. Ernst Federal Research Center for Animal Husbandry

Andrey A. Palyanov, Candidate of Technical Sciences, department
head, L.K. Ernst Federal Research Center for Animal Husbandry

Alexander A. Sermyagin, Candidate of Agricultural Sciences, branch
director, L.K. Ernst Federal Research Center for Animal Husbandry

Nikolay V. Sivkin, Candidate of Agricultural Sciences, scientific
secretary, L.K. Ernst Federal Research Center for Animal Husbandry

Galina N. Singina, Candidate of Biological Sciences, laboratory head,
L.K. Ernst Federal Research Center for Animal Husbandry

Managing editor

Anastasiya I. Ershova, head of the Information Policy and
International Cooperation Department, L.K. Ernst Federal Research
Center for Animal Husbandry

Содержание

Биологические науки

○ Костюнина О.В., Романенкова О.С., Алейникова О.В. Молекулярно-генетические механизмы образования скорлупы у кур	4—15
○ Зайцев С.Ю. Супрамолекулярные ферментные системы животных как модели для физико-химической биологии и медицины	16—32

Зоотехния и ветеринария

○ Курочкин А.А., Притужалова А.О., Кузьмина Т.И., Станишевская О.И. Лиофилизация мужских гамет сельскохозяйственных животных и птиц: достижения, проблемы, перспективы	33—52
○ Луканина В.А., Чинаров Р.Ю. Развитие технологии лапароскопического извлечения ооцитов у овец	53—75
○ Боголюбова Н.В., Некрасов Р.В. Роль факторов липидного питания в процессе метаногенеза у жвачных	76—87

Contents

Biological Sciences

○ O.V. Kostyunina, O.S. Romanenkova, O.V. Aleynikova Molecular and genetic mechanisms of egg shell formation	4—15
○ S.Yu. Zaitsev Supramolecular enzyme systems of animals as models for physical-chemical biology and medicine	16—32

Animal and Veterinary Science

○ A.A. Kurochkin, A.O. Prituzhalova, T.I. Kuzmina, O.I. Stanishevskaya Lyophilization of male gametes of agricultural animals and birds: achievements, problems, prospects	33—52
○ V.A. Lukanina, R. Yu. Chinarov Development of laparoscopic oocyte technology in sheep	53—75
○ N.V. Bogolyubova, R.V. Nekrasov The role of lipid nutrition on the methanogenesis in ruminants	76—87

УДК 636.5:637.447: 636.082.12

Молекулярно-генетические механизмы образования скорлупы у кур

Костюнина О.В., О.С. Романенкова,
О.В. Алейникова

ФГБНУ ФИЦ ВИЖ им. Л.К. Эрнста
Московская обл., Россия

Аннотация. Яйца являются одним из наиболее востребованных источников доступного животного белка. Качество яичной скорлупы представляет особенный биологический интерес и имеет экономическое значение для птицеводства. Огромные потери, вызванные ухудшением качества яичной скорлупы, стали актуальной проблемой при производстве племенного и пищевого яйца. Ухудшение качества яичной скорлупы обуславливает риск заболеваний пищевого происхождения у потребителей. В обзоре представлен анализ литературных данных о молекулярно-генетических механизмах образования яичной скорлупы. Транскриптомный анализ скорлуповой железы у различающихся по возрасту кур-несушек показал дифференциальную экспрессию генов *FGF14*, *COL25A1*, *GPX8* и *GRXCR1*. Анализ функциональных аннотаций показал их участие в процессах, связанных с кальцификацией и кутикуляризацией яичной скорлупы. Исследование транскриптома 49-недельных кур, разделенных на группы в зависимости от качества яичной скорлупы, показало, что ген *KRT14* являлся одним из генов с наибольшей разницей между группами с прочной и хрупкой яичной скорлупой. После сверхэкспрессии *KRT14* в эпителиальных клетках матки экспрессия *OC-116*, *CALB1* и *BST1* значительно увеличивается, в то время как экспрессия *OC-17* значительно снижается. Сравнение дифференциально экспрессируемых генов в двух независимых исследованиях, выполненных на курах с различными признаками качества скорлупы, показало наличие 16 генов, экспрессия которых носила схожий характер. Идентифицированные гены участвуют в различных биологических процессах и выполняют разнообразные функции. Так, кодируемый геном *TTYH3* белок функционирует как кальций(2+)-активируемый хлорид(-) канал большой проводимости. Ген *ITPKA* регулирует метаболизм инозитолфосфата, являющегося субстратом для циклической АМФ-зависимой протеинкиназы, кальций/кальмодулин-зависимой протеинкиназы II и протеинкиназы C *in vitro*. *ITPKA* один из генов, которые связывают с крапинками яичной скорлупы. Таким образом, выполненный анализ литературных данных показал, что молекулярно-генетические механизмы образования яичной скорлупы сложны и до конца не изучены. Проведенные исследования демонстрируют роль дифференциально-экспрессируемых генов в различных процессах, в том числе потенциальное их участие в процессе кальцификации.

Ключевые слова: куры, яйцо, скорлупа, экспрессия, ген

Для цитирования: Костюнина О.В., Романенкова О.С., Алейникова О.В. Молекулярно-генетические механизмы образования скорлупы у кур // Успехи наук о животных. 2025. № 1. С. 4—15. doi:10.25687/3034-493X.2025.2.1.001

Molecular and genetic mechanisms of egg shell formation

O.V. Kostyunina, O.S. Romanenkova,
O.V. Aleynikova

L.K. Ernst Federal Research Center for Animal Husbandry
Moscow Region, Russia

Abstract. Eggs are one of the most sought-after sources of available animal protein. Eggshell quality is of particular biological interest and economic importance to the poultry industry. Huge losses caused by eggshell quality deterioration have become an urgent problem in the production of breeding and food eggs. Deterioration of eggshell quality causes the risk of foodborne diseases in consumers. This review analyzes the literature data on molecular and genetic mechanisms of eggshell formation. Transcriptome analysis of the eggshell gland in laying hens differing in age showed differential expression of *FGF14*, *COL25A1*, *GPX8* and *GRXCR1* genes. Functional annotation analysis showed their involvement in processes related to eggshell calcification and cuticularization. Examination of the transcriptome of 49-week-old hens divided into groups according to eggshell quality showed that the *KRT14* gene was one of the genes with the largest difference between groups with strong and fragile eggshells. Following *KRT14* overexpression in uterine epithelial cells, the expression of *OC-116*, *CALB1* and *BST1* increases significantly, while *OC-17* expression decreases significantly. Comparison of differentially expressed genes in two independent studies performed on chickens with different shell quality traits revealed 16 genes whose expression patterns were similar. The identified genes are involved in various biological processes and perform a variety of functions. Thus, the protein encoded by the *TTYH3* gene functions as a calcium(2+)-activated chloride(-) channel of large conductance. The *ITPKA* gene regulates the metabolism of inositol phosphate, which is a substrate for cyclic AMP-dependent protein kinase, calcium/calmodulin-dependent protein kinase II, and protein kinase C *in vitro*. *ITPKA* is one of the genes that bind to eggshell speckles. Thus, the performed analysis of literature data showed that molecular genetic mechanisms of eggshell formation are complex and not fully understood. The studies demonstrate the role of differentially expressed genes in various processes, including their potential participation in the calcification process.

Keywords: chickens, egg, shell, expression, gene.

For citation: Kostyunina OV, Romanenkova OS, Aleynikova OV. Molecular and genetic mechanisms of egg shell formation. Ernst Journal of Animal Science. 2025. 1: 4—15. Russian. doi:10.25687/3034-493X.2025.2.1.001

Птичье яйцо содержит витамины, минералы и белки (белок и желток), липиды желтка и соли кальция (яичная скорлупа), необходимые для развития зародыша. Яйцо имеет высокую пищевую ценность благодаря хорошо сбалансированному источнику легкоусвояемых аминокислот [1]. Яйца, как один из наиболее востребованных источников доступного животного белка, пользуются большой популярностью у потребителей во всем мире [2].

Курица производит клейдоевое яйцо [3], представляющее собой полностью самодостаточную и асептическую биологическую емкость, содержащую все компоненты, необходимые для полного внеутробного развития оплодотворенной яйцеклетки в жизнеспособного цыпленка за 21 день. Для решения этой задачи в яйце присутствует широкий спектр средств биологической активности и естественной защиты [4, 5].

Чтобы противостоять физическому и/или микробному воздействию, яйцо обладает двумя основными защитными механизмами: системой химической защиты, состоящей из белков с антимикробными свойствами, распределенными во всех отделах [4, 5, 6, 7], и неповрежденную яичную скорлупу, которая функционирует как физический барьер для защиты от бактериальной инвазии [7, 8].

Отличительными особенностями яичной скорлупы птиц по сравнению с костью или зубами являются характер минерального отложения – карбоната кальция в виде кальцита, а также отсутствие клеточно-направленной сборки при ее формировании. Скорлупа птичьего яйца отличается своими механическими свойствами. У кур этот тонкий минеральный слой толщиной около 0,3 мм способен выдерживать статическое давление более 3 кг, а его образование в течение 20 часов является одним из самых быстрых известных процессов биоминерализации [9].

Целью данного обзора явился анализ литературных данных о молекулярно-генетических механизмах образования яичной скорлупы.

Яичная скорлупа представляет собой высокоупорядоченную и минерализованную структуру, состоящую из двухслойной мембраны (внутренней и внешней), мамиллярного слоя, палисадного слоя, вертикального кристаллического слоя и слоя кутикулы, которая быстро формируется (<20 ч для кур-несушек) при физиологических температурах (<40°C) [10-13]. Она состоит из тригональной фазы карбоната кальция – кальцита, который является его наиболее стабильной полиморфной модификацией при комнатной температуре. У подавляющего большинства видов птиц масса яичной скорлупы пропорциональна массе яйца [14] и составляет 10–11% от его массы. Скорлупа содержит 1,6% воды, 3,3–3,5% органической матрицы с включением мембран яичной скорлупы и 95% неорганических минералов, преимущественно представленных карбонатом кальция (98,4% от минеральной части). Также в скорлупе присутствует фосфор и другие микроэлементы [15].

Качество яичной скорлупы не только представляет биологический интерес, но и имеет экономическое значение для птицеводства. Огромные потери, вызванные ухудшением качества яичной скорлупы, стали актуальной проблемой для яичной отрасли. Ухудшение качества яичной скорлупы обуславливает риск заболеваний пищевого происхождения у потребителей [16]. Поэтому улучшение качества яичной скорлупы имеет решающее значение для птицеводства и здоровья человека [17].

Сообщается, что частота появления трещин и разбитых яиц составляет до 12–20% в поздний период яйцекладки [18, 19].



Рисунок 1. Яйца с дефектом скорлупы (фото авторов)

Куриное яйцо формируется в левом яичнике и яйцевом курицы. Яичник поддерживает накопление белков яичного желтка и созревание яйцеклетки. После овуляции желток попадает в яйцевод, где белок, оболочки яичной скорлупы и яичная скорлупа последовательно откладываются в разных сегментах репродуктивного тракта курицы (большом, белом перешейке и матке, соответственно). Матка (скорлуповая железа) состоит из железистых и просветных эпителиальных клеток, секреты которых способствуют биоминерализации яичной скорлупы. Процесс образования яичной скорлупы разделяют на три существенных этапа: начало роста кристаллов, линейный рост кристаллов и прекращение минерализации [8, 20, 21]. Ультраструктура яичной скорлупы регулируется белками органического матрикса, которые контролируют процесс минерализации и влияют на биомеханические свойства яичной скорлупы [22]. Исследования ассоциации между полиморфизмом генов, кодирующих белки скорлупы, и характеристиками скорлупы показали, что определенные аллели коррелируют с механическими свойствами яичной скорлупы [23, 24]. Поскольку кристалл является основным компонентом конструкции яичной скорлупы, было обнаружено, что аллели матричных белков и генов, участвующих в ее формировании, также связаны с размером и ориентацией кристаллов [21, 24, 25]. Значительный прогресс в понимании сложной природы яичной скорлупы и ее образования в яйцевом курицы был достигнут благодаря работе Манна и сотрудников [26], которые использовали протеомный подход для идентификации 528 белков, содержащихся в яичной скорлупе.

В яичной скорлупе обнаружены три компонента яичного белка: овальбумин [27], лизоцим [28] и овотрансферрин [29]. Также яичная скорлупа содержит следующие белки: остеопонтин, фосфорилированный гликопротеин, присутствующий в костях и других твердых тканях [29], и кластерин, секреторный гликопротеин, который также содержится в яичном белке [30]. Овоклеидин-17 (ОС-17) был первым выделенным белком яичной скорлупы [27]. Этот секреторный белок (ОС-17) представляет собой лектиноподобный фосфопротеин С-типа, который встречается в гликозилированной (23 кДа) и негликозилированной (17 кДа) формах в матриксе скорлупы [31]. Овоклеидин-116 (ОС-116) был первым клонированным белком матрикса яичной скорлупы [32]. ОС-116 образует белковое ядро дерматансульфатного протеогликана массой 120-200 кДа, называемого овогликаном [33, 34], который обнаруживается в компактной кальцинированной яичной скорлупе [32]. Овокаликсин-32 (ОСХ-32), специфичный для матки белок массой 32 кДа, концентрируется во внешней кальцинированной области и в кутикуле кальцинированной

оболочки [35]. Овокаликсин-36 (ОСХ-36) представляет собой белок массой 36 кДа, обнаруженный только в скорлуповой железе (матке), где происходит кальцификация яичной скорлупы [36]. Уровни экспрессии ОСХ-36 в матке сильно повышаются во время кальцификации яичной скорлупы. ОСХ-36 преимущественно локализован во внутренней части оболочки и гомологичен белкам врожденного иммунного ответа [36]. Овокаликсин-21 (ОСХ-21) — еще один белок, специфичный для яичной скорлупы [37].

Было обнаружено, что маркеры овальбумина и овотрансферрина связаны с размером кристаллов, тогда как маркеры овоклеидина-116 и овокаликсина-32 были связаны с ориентацией кристаллов [25].

Дифференциальная экспрессия генов и белков. Замечено, что с возрастом кур-несушек увеличивается количество поврежденных яиц с тонкой скорлупой, а яйценоскость снижается [38, 39]. Яичная скорлупа в поздний период яйцекладки имеет меньшую прочность, а также большую вариативность структурных свойств, таких как толщина, морфология зерен и кристаллическая текстура [40]. Кроме того, с возрастом частота слияния в мамиллярном слое уменьшается [41].

Feng и сотрудники [42] провели анализ транскриптома матки, чтобы определить, что измененная экспрессия генов матричных белков в матке кур-несушек на поздней стадии яйцекладки может вызвать нарушение ультраструктуры яичной скорлупы и ее механических свойств. Показано, что экспрессия генов, кодирующих транспортеры ионов и матричные белки (*ATP2A2*, *SCNN1G*, *CA2* и овокаликсин-36), варьируется с возрастом кур-несушек [43]. Выявлено, что снижение плотности желез и сдвиг баланса между эстрогеновыми рецепторами α и β в скорлуповой железе могут быть критическими факторами, объясняющими влияние возраста курицы на качество скорлупы [44].

Li и коллеги [17] провели транскриптомный анализ скорлуповой железы у старых и молодых кур-несушек для идентификации потенциальных мРНК и днРНК, регулирующих образование скорлупы у кур-несушек. Сравнение различий в профилях экспрессии длинных некодирующих РНК (днРНК) и мРНК между старыми и молодыми курами-несушками методом высокопроизводительного секвенирования РНК для выявления генов-кандидатов, связанных со старением в матке кур-несушек позволило обнаружить 176 и 383 дифференциально экспрессируемых днРНК и мРНК, соответственно. Анализ функциональных аннотаций показал, что днРНК и мРНК участвуют в «метаболическом процессе фосфатсодержащих соединений», «митохондриальных протон-транспортирующих АТФ-синтазных комплексах», «транспорте неорганических анионов» и других процессах, связанных с кальцификацией и кутикуляризацией яичной скорлупы. С помощью комплексного анализа было обнаружено, что некоторые важные гены, такие как *FGF14*, *COL25A1*, *GPX8* и *GRXCR1*, и соответствующие им днРНК экспрессируются по-разному между двумя группами. Кроме того, показано, что *TCONS_00181492*, *TCONS_03234147* и *TCONS_03123639* в матке кур-несушек вызывают ухудшение качества яичной скорлупы в конце периода яйцекладки за счет повышения экспрессии соответствующих генов-мишеней *FGF14*, *COL25A1* и *GRXCR1*, а также снижения экспрессии целевого гена *GPX8* по *TCONS_01464392*.

Sun и коллеги [45] методом qPCR изучали связь генов *CALB1*, *SPP1*, *DMP4*, *BMP2* и *SLIT2* с кальцификацией и механическими свойствами яичной скорлупы у 360 кур-несушек породы белый леггорн в возрасте 60 недель. Было обнаружено, что экспрессия гена *CALB1* в матке кур с прочной скорлупой была примерно в 3 раза выше ($P < 0,05$), чем в группе с хрупкой скорлупой. Экспрессия *DMP4* была значительно выше (в 2 раза, $P < 0,05$) в матке кур с хрупкой скорлупой. По генам *SPP1*, *SLIT2* и *BMP2* между этими двумя группами не наблюдалось различий.

Исследование транскриптома 49-недельных кур, разделенных на группы в зависимости от качества яичной скорлупы, выполненное с использованием RNA-Seq, позволило обнаружить в общей сложности 889 дифференциально экспрессируемых генов. Из них 255 были значительно повышены у кур с нормальной прочностью скорлупы, а 634 были значительно повышены у кур с низкой прочностью скорлупы, что указывает на то, что гены матки по-разному экспрессируются в этих группах во время кальцификации яичной скорлупы. Гены некоторых матриксных белков, такие как *OC-116*, *LTF* и *SPP1*, также экспрессировались по-разному в двух группах. Гены внеклеточного матрикса, *ACAD* (связывание углеводов), *ITGA8* (связывание ионов металлов), *LGALS3* (связывание углеводов) и *COL11A1* (связывание внеклеточного матрикса) были дифференциально экспрессированы между двумя группами [46].

В таблице 1 представлен перечень наиболее значимо различающихся по уровню экспрессии генов [46].

Таблица 1. Гены, наиболее значимо различающиеся по уровню экспрессии, в группах кур с различной прочностью скорлупы [46].

Ген	Название	P-значение
<i>OLFM4</i>	Предшественник ольфактомедин-4	7,61E-15
<i>GUCA2A</i>	Предшественник активатора гуанилатциклазы 2A (гуанилин)	3,17E-24
<i>UPK1B</i>	Уроплакин 1B	4,88E-14
<i>ENSGALG00000027770</i>	Неохарактеризованный белок	3,99E-10
<i>COL10A1</i>	Цепь коллагена альфа-1(X)	1,70E-38
<i>CDX-A</i>	Гомеобоксный белок CDX-1	2,27E-24
<i>C1QTNF4</i>	Комплемент C1q белок 4, связанный с фактором некроза опухоли	1,31E-19
<i>TNR</i>	Предшественник тенасцина-R	4,98E-23
<i>AVD</i>	Авидин	8,00E-21
<i>HOXD4</i>	Гомеобоксный белок Нох-D4	1,54E-11
<i>CAPN9</i>	Кальпаин-9	6,01E-08
<i>A2ML2</i>	Альфа-2-макроглобулинподобный белок 2	2,69E-13
<i>MUC5B</i>	Муцин-5B	5,17E-17
<i>GIF</i>	Фактор взаимодействия GRF1	6,98E-14
<i>SLC7A11</i>	Транспортер цистина/глутамата	1,16E-13
<i>MME</i>	Неприлизин	5,04E-14
<i>DMB1</i>	Главный комплекс гистосовместимости, класс II, DM beta 1	1,81E-11
<i>TGM4</i>	Белок-глутамин гамма-глутамилтрансфераза 4	7,45E-12
<i>ABCA4</i>	Ретиналь-специфическая фосфолипид-транспортирующая АТФаза ABCA4	3,20E-09
<i>HOXD8</i>	Гомеобоксный белок Нох-D8	3,46E-13
<i>TUBA4A</i>	Цепь тубулина альфа-4A	2,28E-08
<i>MCTP1</i>	Множественный белок 1, содержащий домен C2 и трансмембранный домен	3,41E-11
<i>SPOCK1</i>	Тестикан-1	2,35E-08
<i>PIGR</i>	Полимерный иммуноглобулиновый рецептор	7,91E-09
<i>SERPINB14</i>	Овальбумин	8,65E-08

Wu и соавторы [47] выполняли секвенирование транскриптома и ЖХ-МС/МС в матке кур с различными признаками качества скорлупы и осуществляли поиск дифференциально экспрессируемых генов и дифференциально экспрессируемых белков. Всего было идентифицировано 1028 дифференциально экспрессируемых генов и 270 дифференциально экспрессируемых белков. Они обнаружили, что *KRT14* является одним из генов с наибольшей разницей уровня экспрессии между группой с прочной яичной скорлупой и группой с хрупкой яичной скорлупой. Было показано, что после сверхэкспрессии *KRT14* в эпителиальных клетках матки экспрессия *OC-116* (овоклеидин-116), *CALB1* (кальбиндин 1) и *BST1* (АДФ-рибозилциклаза 2) значительно увеличивается, в то время как экспрессия *OC-17* (овоклеидин-17) значительно снижается.

Сравнение дифференциально экспрессируемых генов в исследованиях Wu и коллег [47] и Zhang и коллег [46] показало, что 107 генов были общими, причем экспрессия 16 из них носила схожий характер (табл. 2).

Таблица 2. Гены, экспрессия которых носит схожий характер

№п/п	Ген	log2 ratio [46]	log2 ratio [47]
1	<i>FOLH1</i>	1,470739	1,126098
2	<i>ITGAV</i>	1,30675	0,741216
3	<i>LRRTM4</i>	-1,81082	-2,68694
4	<i>HELZ2</i>	1,083089	0,801149
5	<i>LAMTOR2</i>	-0,63014	-0,89721
6	<i>SAMD9L</i>	1,892504	1,594264
7	<i>CSF1R</i>	0,615531	0,894487
8	<i>MLF1</i>	0,771552	0,998807
9	<i>ATP13A3</i>	0,756934	0,662906
10	<i>ANKRD33B</i>	-2,51713	-0,66448
11	<i>ITPKA</i>	1,683912	0,98333
12	<i>PANK3</i>	0,735935	0,64208
13	<i>TTYH3</i>	0,621895	0,750956
14	<i>RSAD2</i>	2,297973	1,52323
15	<i>IL34</i>	-0,81559	-0,8597
16	<i>MGAT5</i>	0,642984	0,949199

Примечание: log2 ratio – соотношение log2 в группах с низкой прочностью яичной скорлупы и нормальной прочностью яичной скорлупы

На рисунках 2-3 показаны молекулярные функции, выполняемые этими генами, и биологические процессы, в которых они участвуют. Построение диаграмм выполняли с использованием ресурса <https://pantherdb.org/>



Рисунок 2. Молекулярная функция генов

АТФ-зависимая активность: *HELZ2*, *ATP13A3*

Связывание: *ITGAV*, *IL34*, *CSF1R*, *RSAD2*

Каталитическая активность: *MGAT5*, *FOLH1*, *CSF1R*, *HELZ2*, *PANK3*, *ITPKA*

Активность молекулярного преобразователя: *CSF1R*

Транспорт: *ТТУН3*, *ATP13A3*.



Рисунок 3. Биологические процессы, в которых участвуют гены.

Биологическая регуляция: *ITGAV*, *IL34*, *LAMTOR2*, *CSF1R*, *MLF1*

Клеточный процесс: *ITGAV*, *LAMTOR2*, *CSF1R*, *PANK3*, *ITPKA*, *ATP13A3*

Процесс развития: *ITGAV*, *CSF1R*

Гомеостатический процесс: *ATP13A3*

Локализация: *ATP13A3*

Метаболический процесс: *MGAT5*, *PANK3*, *ITPKA*

Многоклеточный организменный процесс: *ITGAV*, *CSF1R*

Реакция на стимул: *ITGAV*, *LAMTOR2*, *CSF1R*.

Идентифицированные гены участвуют в различных биологических процессах и выполняют разнообразные функции.

FOLH1 – ген, кодирующий фолатгидролазу – фермент, гидролизующий репродуктивно-значимый витамин фолат. Он был предложен в качестве «отпечатка селекции» у материнских линий кур [48]. Экспрессия гена *FOLH1* была снижена у медленнорастущих цыплят [49].

Интегрины альфа-V (ITGAV) являются рецепторами витронектина, цитотактина, фибронектина, фибриногена, ламинина, матриксной металлопротеиназы-2, остеопонтина, остеомодулина, протромбина, тромбоспондина, TGF β 1 и vWF. Интегрины альфа-V могут играть роль в имплантации эмбрионов. Они участвуют в ряде процессов развития, включая васкулогенез и ангиогенез [50]. *ITGAV* был одним из дифференциально экспрессируемых генов при изучении показателей роста кур [51].

LRRTM4 представляет собой белок трансинаптической адгезии, регулирующий сборку глутаматергических синапсов на дендритах центральных нейронов [52], играющий роль в развитии и поддержании нервной системы позвоночных. *LRRTM4* является гендерно-зависимым маркером устойчивости к асциту у бройлеров [53].

HELZ2 - 3'-5' экзорибонуклеаза, может разрушать высокоструктурированные РНК посредством своей согласованной АТФ-зависимой РНК-хеликазной активности и 3'-5' экзорибонуклеазной активности. Действует как коактиватор транскрипции для ряда ядерных рецепторов, включая PPARA, PPARG, THRA, THRB и RXRA [54].

LAMTOR2 участвует в распознавании аминокислот и активации mTORC1 п – и сигнального комплекса, способствующего росту клеток в ответ на факторы роста, уровни энергии и аминокислоты. Полногеномное картирование признаков отбора с использованием массива высокой плотности позволило идентифицировать гены-кандидаты для признаков роста и местной адаптации у кур, среди которых был обнаружен ген *LAMTOR2* [55].

Ген *SAMD9L* может участвовать в слиянии эндосом. *SAMD9L* был ассоциирован с живой массой цыплят локальной породы гана в возрасте 22 недель [56]. Комплексный анализ транскриптомов костей и хрящей кур показал, что ген *SAMD9L* являлся дифференциально экспрессируемым геном [57]. Сниженная экспрессия *SAMD9L* отмечена в тканях маточно-влагалищного соединения, содержащих каналцы для хранения спермы (SST), у кур, подвергшихся тепловому стрессу [58].

CSF1R – тирозин-протеинкиназа, которая действует как рецептор клеточной поверхности для CSF1 и IL34 и играет важную роль в регуляции выживания, пролиферации и дифференцировки гемопоэтических клеток-предшественников, особенно мононуклеарных фагоцитов, таких как макрофаги и моноциты. Она играет важную роль в регуляции пролиферации и дифференцировки остеокластов, регуляции резорбции кости и необходим для нормального развития костей.

MLF1 участвует в детерминации первичных кроветворных предшественников путем ограничения образования эритроидов и усиления образования миелоидных отложений. Связывает ДНК и влияет на экспрессию ряда генов, поэтому может действовать как фактор транскрипции в ядре.

ATP13A3 кодирует АТФ-управляемый насос, который участвует в эндоцитоз-зависимом транспорте полиаминов. В пределах гена *ATP13A3* был выявлен значимый SNP, связанный с уровнем антител к болезни Ньюкасла [59]. Показано, что плотность посадки влияет на экспрессию *ATP13A3* в яйцевом утке [60].

ANKRD33B кодирует белок 33B, содержащий домен повтора анкирина, предполагается, что он обеспечивает активность связывания ДНК. Экспрессируется в мозге, энтодерме эмбриона, хорде и сетчатке. *ANKRD33B* был идентифицирован как отпечаток селекции у кур пород русская белая и белый корниш [61], у локальных корейских кур [62].

Ген *ITPKA* регулирует метаболизм инозитолфосфата путем фосфорилирования вторичного посредника инозитол-1,4,5-трифосфата до Ins(1,3,4,5)P $_4$. Активность инозитол-1,4,5-трифосфат-3-киназы зависит от кальция/кальмодулина, так и механизмов фосфорилирования белка. Он также является субстратом для циклической АМФ-зависимой протеинкиназы, кальций/кальмодулин-зависимой протеинкиназы II

и протеинкиназы *C in vitro*. *ITPKA* один из генов, которые связывают с крапинками яичной скорлупы [63]. *ITPKA* локализован в регионе, связанном с приростом живой массы тела, потреблением корма и конверсией корма у японских перепелов [64].

PANK3 кодирует белок, принадлежащий семейству пантотенаткиназ. Пантотенаткиназа катализирует первый обязательный шаг универсального пути биосинтеза, ведущего к КоА, и подлечит регуляции посредством ингибирования КоА по обратной связи, наиболее обильно экспрессируется в печени. *PANK3* был предложен в качестве потенциального гена-кандидата, регулирующего особенности состава жирных кислот в мышцах куриной грудки [65].

Ген *TTYH3* кодирует члена семейства белков твити 3. Члены этого семейства функционируют как каналы хлорид-анионов. Кодированный геном *TTYH3* белок функционирует как кальций(2+)-активируемый хлорид(-) канал большой проводимости.

Белок, кодируемый геном *RSAD2*, представляет собой индуцируемый интерфероном противовирусный белок, который принадлежит к суперсемейству ферментов S-аденозил-L-метионина (SAM). Он играет роль в клеточном противовирусном ответе и передаче сигналов врожденного иммунитета.

Интерлейкин-34 (*IL34*) представляет собой цитокин, который способствует дифференцировке и жизнеспособности моноцитов и макрофагов посредством рецептора колониестимулирующего фактора-1.

Белок, кодируемый геном *MGAT5*, принадлежит к семейству гликозилтрансфераз. Это один из важнейших ферментов, участвующих в регуляции биосинтеза гликопротеиновых олигосахаридов. Изменения олигосахаридов на гликопротеинах клеточной поверхности вызывают значительные изменения в адгезионном или миграционном поведении клетки.

Заключение. Процесс образования скорлупы яиц сложен и до конца не исследован. Изучение молекулярно-генетических механизмов, лежащих в основе данного процесса, имеет важное значение в аспекте идентификации факторов, оказывающих влияние на качество и прочность яичной скорлупы. Выполненные различными учеными исследования, позволили определить дифференциально экспрессируемые гены, роль некоторых из них в процессе кальцификации очевидна. Вместе с тем, перечень генов от исследования к исследованию варьируется и однозначного ответа на вопрос их участия в образовании скорлупы нет. Дальнейшие исследования в данном направлении, выполненные на курах различных пород, расширят понимание молекулярно-генетической основы кальциевого обмена в организме кур, позволят идентифицировать полиморфизмы, ассоциированные с качеством скорлупы, и сделают возможным их использование в селекционном процессе.

Литература.

1. Seuss-Baum, I. Nutritional evaluation of egg compounds / I. Seuss-Baum // Bioactive egg compounds / Ed.: R. Huopalahti, R. López-Fandiño, M. Anton, R. Schade. – Verlag Berlin Heidelberg, Springer Publ., 2007. – P.117–144.: – ISBN: 978-3-540-37883-9. – full_text.
2. Mottet, A. Global poultry production: Current state and future outlook and challenges / A. Mottet, G. Tempio // World's Poult. Sci. J. – 2017. – V. 73. –P. 1–12. DOI:10.1017/S0043933917000071.
3. Schmidt-Nielsen, K. Animal Physiology: adaptation and environment / K. Schmidt-Nielsen // New York: Cambridge University Press. - 1997. - 607 p.
4. Anton, M. Bioactive egg components and their potential uses / M. Anton, F. Nau, Y. Nys // Worlds Poult Sci J. – 2006. – V. 62 (03). – P. 429–438. DOI: 10.1017/S004393390600105X.
5. Rehault, S. Biological activities of the egg / S. Rehault, M. Anton, F. Nau [et al.] // INRA Prod Anim. –2007. – V. 20 (4). – P. 337–347. DOI: 10.20870/productions-animales.2007.20.4.3470
6. Moreau, T. Antimicrobial Proteins and Peptides in Avian Eggshell: Structural Diversity and Potential Roles in Biomineralization / T. Moreau, J. Gautron, M. [et al.] // Front Immunol. 2022. –V. 13. - P.946428. DOI: 10.3389/fimmu.2022.946428.

7. Mine, Y. Egg bioscience and biotechnology / Y. Mine // Hoboken, New Jersey: John Wileys & Sons, Inc. –2008. – 376p.
8. Gautron J. Function of eggshell matrix proteins / J. Gautron, Y. Nys // Bioactive egg compounds / Ed.: R. Huopalahti, R. López-Fandiño, M. Anton, R. Schade. – Germany, Springer-Verlag Publ., 2007. – P. 109–115. – ISBN: 978-3-540-37883-9. – full_text.
9. Gautron, J. Avian eggshell biomineralization: an update on its structure, mineralogy and protein tool kit / J. Gautron, L. Stapane, N. Le Roy [et al.] // BMC Mol Cell Biol. – 2021. – V. 22 (1). – P. 11. DOI: 10.1186/s12860-021-00350-0.
10. Hincke, M.T. The eggshell: structure, composition and mineralization / M.T. Hincke, Y. Nys, J. Gautron [et al.] // Front Biosci. – 2012. – V. 17. – P. 1266–1280. DOI: 10.2741/3985.
11. Nys, Y. Avian eggshell mineralization / Y. Nys, M.T. Hincke, J.L. Arias [et al.] // Poult Avian Biol Rev. – 1999. – V. 10 (3). – P. 143–166.
12. Sauveur, B. Reproduction des volailles et production d'oeufs / B. Sauveur, M. Derevier // Quae edn. Paris: INRA –1988.
13. Solomon, S.E. Egg and egg quality / S.E.Solomon // London, England: Wolfe publishing. – 1991. – 149 p.
14. Ar, A. The avian egg: mass and strength / A. Ar, H. Rahn, V.C. Paganelli // Condor. – 1979. – V.81 (4). – P. 331–337. DOI: 10.2307/1366955.
15. Dennis, J.E. Microstructure of matrix and mineral components of eggshells from white leghorn chickens (*Gallus gallus*) / J.E. Dennis, S.Q. Xiao, M. Agarwal [et al.] // J Morphol. – 1996. – V.228 (3). – P. 287–306. DOI: 10.1002/(SICI)1097-4687(199606)228:3<287::AID-JMOR2>3.0.CO;2-#.
16. Chen, X. Impact of cuticle quality and eggshell thickness on egg antibacterial efficiency / X. Chen, X. Li, Y. Guo [et al.] // Poult. Sci. – 2019. – V. 98. – P. 940–948.
17. Li, G. Genome-Wide Analysis of lncRNA and mRNA Expression in the Uterus of Laying Hens during Aging / G. Li, X. Yang, J. Li, B. Zhang // Genes– 2023. – V. 14. – P. 639. DOI.org/10.3390/genes14030639.
18. Travel, A. Effect of hen age, moult, laying environment and egg storage on egg quality / A. Travel, Y. Nys, M. Bain // Improving the Safety and Quality of Eggs and Egg Products. – 2011. – P. 300–329. DOI:10.1533/9780857093912.3.300
19. Nys, Y. Improving the Safety and Quality of Eggs and Egg Products / Y. Nys, M. Bain, F. van Immerseel // Woodhead Publishing Limited: Cambridge. UK. –2011. –P.300–329.
20. Marie, P. Quantitative proteomics and bioinformatic analysis provide new insight into protein function during avian eggshell biomineralization / P Marie, V. Labas, A. Brionne [et al.] // J. Proteom. –2015. – V. 126. – P. 140–154.
21. Nys, Y. Avian eggshell mineralization: biochemical and functional characterization of matrix proteins / Y. Nys, J. Gautron, J.M. Garcia-Ruiz, M.T. Hincke // C R Palevol. – 2004. – V. 3. – P. 549–562. DOI: 10.1016/j.crpv.2004.08.002.
22. Brionne, A. Hen uterine gene expression profiling during eggshell formation reveals putative proteins involved in the supply of minerals or in the shell mineralization process / A. Brionne, Y. Nys, C. Hennequet-Antier, J. Gautron // BMC Genomics. – 2014. – V. 15. – P. 220. DOI: 10.1186/1471-2164-15-220.
23. Belcher, A.M. Control of crystal phase switching and orientation by soluble mollusc-shell proteins / A.M. Belcher, R.J. Christensen, P.K. Hansma // Nature. –1996. – V. 381(6577). – P. 56–58. DOI:10.1038/381056a0.
24. Dunn, I.C. Polymorphisms in eggshell organic matrix genes are associated with eggshell quality measurements in pedigree Rhode Island Red hens / I.C. Dunn, N.T. Joseph, M. Bain [et al.] // Anim Genet. – 2009. – V. 40 (1). – P. 110–114. DOI: 10.1111/j.1365-2052.2008.01794.x.
25. Dunn, I.C. Genetic variation in eggshell crystal size and orientation is large and these traits are correlated with shell thickness and are associated with eggshell matrix protein markers / I.C. Dunn, A.B. Rodríguez-Navarro, K. Mcdade [et al.] // Animal Genetics. – 2012. – V. 43 (4). – P. 410–418. DOI: 10.1111/j.1365-2052.2011.02280.x.
26. Mann, K. Phosphoproteins of the chicken eggshell calcified layer / K. Mann, J.V. Olsen, B. Macek [et al.] // Proteomics. – 2007. – V. 7 (1). – P. 106–115. DOI: 10.1002/pmic.200600635.
27. Hincke, M.T. Ovalbumin is a component of the chicken eggshell matrix / M.T. Hincke // Connect Tissue Res. – 1995. – V. 31(3). – P. 227–233. DOI: 10.3109/03008209509010814.
28. Hincke, M.T. Identification and localization of lysozyme as a component of the eggshell membranes and shell matrix / M.T. Hincke, J. Gautron, M. Panheleux [et al.] // Matrix Biol. –2000. – V. 19. –P. 443–453. DOI: 10.1016/S0945-053X(00)00095-0.

29. Gautron, J. Ovotransferrin is a matrix protein of the hen eggshell membranes and basal calcified layer / J. Gautron, M.T. Hincke, M. Panhéleux [et al.] // *Connect Tissue Res.* –2001. – V. 42 (4). – P.255–267. DOI: 10.3109/03008200109016840.
30. Mann, K. Disulfide-linked heterodimeric clusterin is a component of the chicken eggshell matrix and egg white / K. Mann, J. Gautron, Y. Nys [et al.] // *Matrix Biol.* –2003. – V. 22 (5). – P. 397–407. DOI: 10.1016/S0945-053X(03)00072-6.
31. Mann, K. The amino acid sequence of ovocleidin 17, a major protein of the avian eggshell calcified layer / K. Mann, F. Siedler // *Biochem Mol Biol Int.* – 1999. – V. 47 (6) . – P. 997–1007.
32. Hincke, M.T. Molecular cloning and ultrastructural localization of the core protein of an eggshell matrix proteoglycan, ovocleidin-116 / M.T. Hincke, J. Gautron, C.P. Tsang [et al.] // *J Biol Chem.* – 1999. – V. 274 (46). – P. 32915–32923. DOI: 10.1074/jbc.274.46.32915.
33. Carrino, D.A. Dermatan sulfate proteoglycans from the mineralized matrix of the avian eggshell / D.A. Carrino, J.P. Rodriguez, A.I. Caplan // *Connect Tissue Res.* – 1997. – V. 36 (3). – P. 175–193. DOI: 10.3109/03008209709160219.
34. Fernandez, M.S. Secretion pattern, ultrastructural localization and function of extracellular matrix molecules involved in eggshell formation / M.S. Fernandez, A. Moya, L. Lopez, J.L. Arias // *Matrix Biol.* – 2001. – V. 19. – P. 793–803. DOI: 10.1016/S0945-053X(00)00128-1.
35. Gautron, J. Ovocalyxin-32, a novel chicken eggshell matrix protein: Isolation, amino acid sequencing, cloning and immunocytochemical localization / J. Gautron, M..T. Hincke, K. Mann [et al.] // *J Biol Chem.* – 2001. –V. 276 (42). – P. 39243–39252. DOI: 10.1074/jbc.M104543200.
36. Gautron, J. Cloning of ovocalyxin-36, a novel chicken eggshell protein related to lipopolysaccharide-binding proteins, bactericidal permeability-increasing proteins, and plunc family proteins / J. Gautron, E. Murayama, A.J. Vignal [et al.] // *Biol Chem.* – 2007. – V. 282 (8). – P. 5273–5286. DOI: 10.1074/jbc.M610294200.
37. Gautron, J. Eggshell matrix proteins / J. Gautron, Y. Nys // *Bioactive egg compounds /* Ed.: R. Huopalahti, R. López-Fandiño, M. Anton, R. Schade. – Verlag Berlin Heidelberg, Springer Publ., 2007. – P. 103–108. : – ISBN: 978-3-540-37883-9. – full_text.
38. Joyner, C.J. The effect of age on egg production in the domestic hen / C.J. Joyner, M.J. Peddie, T.G. Taylor // *Gen. Comp. Endocrinol.* – 1987. – V. 65. – P. 331–336.
39. AlBatshan, H.A. Duodenal Calcium Uptake, Femur Ash, and Eggshell Quality Decline with Age and Increase Following Molt / H.A. AlBatshan, S.E. Scheideler, B.L. Black [et al.] // *Poult. Sci.* – 1994. – V. 73. – P. 1590–1596.
40. Athanasiadou, D. Nanostructure, osteopontin, and mechanical properties of calcitic avian eggshell / D. Athanasiadou, W. Jiang, D. Goldbaum [et al.] // *Sci. Adv.* –2018. – V.4: eaar3219. DOI: 10.1126/sciadv.aar3219.
41. Roberts, J.R. Effect of production system and flock age on egg quality and total bacterial load in commercial laying hens / J.R. Roberts, K.K. Chousalkar // *J. Appl. Poult. Res.* – 2014. – V. 23. – P. 59–70.
42. Feng, J. Uterine transcriptome analysis reveals mRNA expression changes associated with the ultrastructure differences of eggshell in young and aged laying hens / J. Feng, H.J. Zhang, S.G. Wu [et al.] // *BMC Genom.* – 2020. – V. 21. – P. 770. DOI: 10.1186/s12864-020-07177-7.
43. Park, J.A. Histological change of uterus endometrium and expression of the eggshell-related genes according to hen age / J.A. Park, E.J. Cho, J.Y. Park, S.H. Sohn // *Korean J. Poult. Sci.* – 2017. – V.44. – P. 19–28.
44. Wistedt, A. Age-related changes in the shell gland and duodenum in relation to shell quality and bone strength in commercial laying hen hybrids / A. Wistedt, Y. Ridderstrale, H. Wall, L. Holm // *Acta. Vet. Scand.* – 2019. – V. 61. –P. 14. DOI: 10.1186/s13028-019-0449-1.
45. Sun, C.J. Expression analysis for candidate genes associated with eggshell mechanical property / C.J. Sun, Z.Y. Duan, L.J. Qu [et al.] // *Journal of Integrative Agriculture.* – V. 15 (2) – 2016. – P. 397–402. ISSN 2095-3119. DOI: 10.1016/S2095-3119(14)60969-2.
46. Zhang, Q. Integrating transcriptome and genome re-sequencing data to identify key genes and mutations affecting chicken eggshell qualities / Q. Zhang, F. Zhu, L. Liu, [et al.] // *PLoS One.* – 2015. – V. 10 (5): e0125890. DOI: 10.1371/journal.pone.0125890.
47. Wu, Y. Multiomic analysis revealed the regulatory role of the KRT14 gene in eggshell quality / Y. Wu, Y. Sun, H. Zhang [et al.] // *Front Genet.* – 2022. – V.13. – P. 927670. DOI: 10.3389/fgene.2022.927670.

48. Hudson, N.J. Data compression can discriminate broilers by selection line, detect haplotypes, and estimate genetic potential for complex phenotypes / N.J. Hudson, R.J. Hawken, R. Okimoto [et al.] // *Poult Sci.* – 2017. – V. 96 (9). – P. 3031–3038. DOI: 10.3382/ps/pex151.
49. Claire D'Andre, H. Identification and characterization of genes that control fat deposition in chickens / H. Claire D'Andre, W. Paul, X. Shen [et al.] // *J. Anim. Sci. Biotechnol.* – 2013. – V. 4. – P. 43. DOI: 10.1186/2049-1891-4-43.
50. Sims, M.A. Cloning and characterisation of ITGAV, the genomic sequence for human cell adhesion protein (vitronectin) receptor alpha subunit, CD51 / M.A. Sims, S.D. Field, M.R. Barnes [et al.] // *Cytogenet Cell Genet.* – 2000. – V. 89 (3-4). – P. 268–271. DOI: 10.1159/000015631.
51. Chen, B. A Genome-Wide mRNA screen and functional analysis reveal foxo3 as a candidate gene for chicken growth / B. Chen, J. Xu, X. He [et al.] // *PLoS One.* – 2015. – V. 10 (9). – e0137087. DOI: 10.1371/journal.pone.0137087.
52. Sinha, R. LRRTM4: A novel regulator of presynaptic inhibition and ribbon synapse arrangements of retinal bipolar cells / R. Sinha, T.J. Siddiqui, N. Padmanabhan [et al.] // *Neuron.* – 2020. – V. 105 (6). – P. 1007–1017.e5. DOI: 10.1016/j.neuron.2019.12.028.
53. Parveen, A. Identification and validation of quantitative trait loci for ascites syndrome in broiler chickens using whole genome resequencing / A. Parveen, C.D. Jackson, S. Dey [et al.] // *BMC Genet.* – 2020. – V. 21 (1). – P. 54. DOI: 10.1186/s12863-020-00859-x.
54. Katano-Toki, A. THRAP3 interacts with HELZ2 and plays a novel role in adipocyte differentiation / A. Katano-Toki, T. Satoh, T. Tomaru [et al.] // *Mol Endocrinol.* – 2013. – V. 27 (5). – P. 769–780. DOI: 10.1210/me.2012-1332.
55. Mastrangelo, S. Genome-wide mapping of signatures of selection using a high-density array identified candidate genes for growth traits and local adaptation in chickens / S. Mastrangelo, S. Ben-Jemaa, F. Perini [et al.] // *Genet. Sel. Evol.* – 2023. – V. 55 (1). – P. 20. DOI: 10.1186/s12711-023-00790-6.
56. Kanlisi, R.A. Genetic architecture of body weight, carcass, and internal organs traits of Ghanaian local chickens / R.A. Kanlisi, Amuzu- E.N. Aweh, A. Naazie [et al.] // *A Front Genet.* – 2024. – V. 15. – P. 1297034. DOI: 10.3389/fgene.2024.1297034.
57. Goldoni, I. Comprehensive analyses of bone and cartilage transcriptomes evince ion transport, inflammation and cartilage development-related genes involved in chickens' femoral head separation / I. Goldoni, A.M.G. Ibelli, L.T. Fernandes [et al.] // *Animals (Basel).* – 2022. – V. 12 (6). – P. 788. DOI: 10.3390/ani12060788.
58. Kubota, S. Transcriptome analysis of the uterovaginal junction containing sperm storage tubules in heat-stressed breeder hens / S. Kubota, P. Pasri, S. Okrathok [et al.] // *Poult Sci.* – 2023. – V. 102 (8). – P. 102797. DOI: 10.1016/j.psj.2023.102797.
59. Walugembe, M. Genetic analyses of tanzanian local chicken ecotypes challenged with newcastle disease virus / M. Walugembe, J.R. Mushi, E.N. Amuzu-Aweh [et al.] // *Genes (Basel).* – 2019. – V. 10 (7). – P. 546. DOI: 10.3390/genes10070546.
60. Pu, F. Transcriptome analysis of oviduct in laying ducks under different stocking densities / F. Pu, X. Xiong, Y. Li [et al.] // *Br. Poult. Sci.* – 2022. – V. 63 (3). – P. 283–290. DOI: 10.1080/00071668.2021.1983917.
61. Abdelmanova, A.S. Unveiling comparative genomic trajectories of selection and key candidate genes in egg-type russian white and meat-type white cornish chickens / A.S. Abdelmanova, A.V. Dotsev, M.N. Romanov [et al.] // *Biology (Basel).* – 2021. – V. 10 (9). – P. 876. DOI: 10.3390/biology10090876.
62. Cho, S. Comparison of selection signatures between korean native and commercial chickens using 600K SNP array data / S. Cho, P. Manjula, M. Kim [et al.] // *Genes (Basel).* – 2021. – V. 12 (6). – P. 824. DOI: 10.3390/genes12060824.
63. Cheng, X. Genome-wide association study exploring the genetic architecture of eggshell speckles in laying hens / X. Cheng, X. Li, M. Yang [et al.] // *BMC Genomics.* – 2023. – V. 24 (1). – P. 704. DOI: 10.1186/s12864-023-09632-7.
64. Alboali, H. Genome-wide association study for body weight and feed consumption traits in Japanese quail using Bayesian approaches / H. Alboali, M.H. Moradi, A.H. Khaltabadi Farahani, H. Mohammadi // *Poult Sci.* – 2024. – V. 103 (1). – P. 103208. DOI: 10.1016/j.psj.2023.103208.
65. Fan, S. Genetic architecture and key regulatory genes of fatty acid composition in Gushi chicken breast muscle determined by GWAS and WGCNA / S. Fan, P. Yuan, S. Li [et al.] // *BMC Genomics.* – 2023. – V. 24 (1). – P. 434. DOI: 10.1186/s12864-023-09503-1.

УДК 636.087.8:615.355+612:636

Супрамолекулярные ферментные системы животных как модели для физико-химической биологии и медицины

Зайцев С.Ю.

ФГБНУ ФИЦ ВИЖ им. Л.К. Эрнста,
Московская обл., Россия

Аннотация. В фундаментальном аспекте сельскохозяйственные животные уже предметно рассматриваются в качестве «физиологических моделей» (скорее даже - «физиолого-биохимических моделей») для исследований по биологии и медицине человека и животных. Автором предложены инновационные подходы для создания и исследования супрамолекулярных «ферментных» систем (СФС) на разных уровнях их структурной организации: от 1го уровня (СФС-1) фермент-субстратных комплексов, «предорганизованных» в монослоях, до СФС 4го уровня (СФС-4) как трехкомпонентных комплексов на основе биополимеров с иммобилизованными липазами. В данном обзоре рассмотрены такие СФС на основе липазы из «поджелудочной железы свиней» в сравнении с другими липазами различного происхождения. Результаты, полученные при исследовании СФС, позволяют разрабатывать новые подходы к структурно-функциональному изучению многих процессов в органах и тканях организма, например, к моделированию физиолого-биохимических процессов в желудочно-кишечном тракте, крови и других тканях животных, а также позволяют создавать инновационные «бионаноматериалы с заданными свойствами».

Ключевые слова: животные, физиолого-биохимические модели, супрамолекулярные ферментные системы, липазы.

Для цитирования: Зайцев С.Ю. Супрамолекулярные ферментные системы животных как модели для физико-химической биологии и медицины // Успехи наук о животных. 2025. № 1. С. 16—32. doi: 10.25687/3034-493X.2025.2.1.002

Supramolecular enzyme systems of animals as models for physical-chemical biology and medicine

S.Yu. Zaitsev

L.K. Ernst Federal Research Center for Animal Husbandry
Moscow Region, Russia

Abstract. In a fundamental aspect, farm animals can be considered as "physiological models" (or rather "physiological-biochemical models") for research in biology and medicine of humans and animals. The author proposes innovative approaches to the creation and study of supramolecular "enzyme" systems (SES) by various levels of their structural organization: from the 1st level (SES-1) enzyme-substrate complexes "pre-organized" in monolayers to SES of the 4th level (SES-4) three-component complexes based on biopolymers with immobilized lipases. This review considers such SES based on lipase "from the pancreas of pigs" in comparison with other lipases of various origins. The results obtained in the study of SES allow us to develop new approaches to the structural and functional study of many processes in the organs and tissues of the body, for example, for modeling physiological and biochemical processes in the gastrointestinal tract, blood and other tissues of animals, and also allow us to create innovative "bionanomaterials with specified properties".

Keywords: animals, physiological-biochemical models, supramolecular enzyme systems, lipases.

For citation: Zaitsev S.Yu. Supramolecular enzyme systems of animals as models for physical-chemical biology and medicine. Ernst Journal of Animal Science. 2025. 1: 16—32. Russian. doi: 10.25687/3034-493X.2025.2.1.002

В последнее время «сельскохозяйственные животные» [1] (свины, крупный рогатый скот, овцы и т.д.) все больше и больше используются как «биомедицинские модели» [1] или «физиолого-биохимические модели» [2, 3] для исследований по биологии и медицине человека и животных (рис. 1, адаптировано из [1]). Так, «инсулин из поджелудочной железы свиней» [4] из-за близости его биологической структуры к человеческой (только «одна замена из 51 аминокислоты в инсулине» [2]), долгое время использовался «в поддержании здоровья людей, больных диабетом» [2, 4].



Рисунок 1. Виды сельскохозяйственных животных, которые могут служить перспективными «физиолого-биохимическими моделями» [1] для исследований, связанных с физико-химической биологией и медициной человека и животных (адаптировано из [1]).

В ряде работ по «физиологии и генетике отдельных видов сельскохозяйственных животных» [3-5], прежде всего, свиней [6-9], отмечается их большая ценность для более глубоко понимания многочисленных проблем «физиологии и генетики человека» [1]. Например, в работе Wolf E. et al. [6] описывается формирование генетически модифицированных свиней как источника клеток, тканей или органов «для ксенотрансплантации» [6]. Благодаря уникальной близости элементов органов и тканей свиней в «структурно-функциональном отношении» [2] к таковым у человека, они могут быть использованы как важные донорские элементы для трансплантации в хирургии после преодоления проблем, связанных «с риском передачи зоонозных патогенов или отторжения тканей трансплантата» [6]. В статье Proudfoot C. et al. [7] представлено использование подходов и методов редактирования генов у свиней и обсуждается возможность использования этой технологии на курах для получения особей, устойчивых к болезням. Например, недавно были получены свиньи с отредактированными генами, устойчивыми к заражению такими опасными вирусными заболеваниями, как «вирус репродуктивного и респираторного синдрома свиней или вирус трансмиссивного гастроэнтерита» [5-8].

Если говорить о фундаментальных проблемах в области биологии живых организмов, то важно подчеркнуть неуклонное увеличение числа публикаций, посвященных

многочисленным «биохимическим реакциям клеточного метаболизма, катализируемых ферментами» [2, 9-11]. Имеющаяся обширная и доступная литература по структурно-функциональным характеристикам ферментов с упором на подробную «классификацию ферментов (КФ)» [11-13] позволяет использовать эти знания в построении метаболических путей всех типов обменов [14-17]. В данном обзоре основное внимание уделяется структурно-функциональной характеристике только липаз из множества липолитических и других ферментов, существующих в природе (на сегодня выделено более 3500 ферментов) [18, 19]. В последнее время активно развиваются подходы, связанные с учетом уровней структурной организации ферментов на базе принципов супрамолекулярной и биоорганической химии, изложенных в монографиях J.-M. Lehn [20], P. Friedrich [21], Ю.А. Овчинникова [22] и других [23-25]. Суммируя вкратце описание из представленных выше источников, можно определить «супрамолекулярные ферментные системы» (СФС) как совокупность сложных комплексов белков с субстратами, рядом «поверхностно-активных веществ» (ПАВ), модификаторами (активаторами, ингибиторами) различных типов и т.п.

В данном обзоре будут обсуждены вопросы получения и структурно-функциональной характеристики СФС на основе липаз из различных источников.

Современные представления о структурной организации и свойствах липолитических ферментов (липаз). Липолитические ферменты включают липазы животных и растений, бактерий и грибов как особых групп ферментов 3-го класса КФ (гидролаз), определяющие направления метаболических процессов в обмене липидов [26-29]. В контексте данного обзора наиболее интересными представляются липазы из ряда бактерий, в которых число аминокислотных остатков (АКО) изменяется в пределах нескольких сотен и, особенно, панкреатическая липаза свиней (Л-1) [29, 30]. Именно Л-1 как наиболее известный фермент («КФ 3.1.1.3»), расщепляющий «различные типы триацилглицеридов (ТАцГ)» [2,31-33], чаще всего используется в качестве «лабораторной модели для оценки других липаз» [31-33].

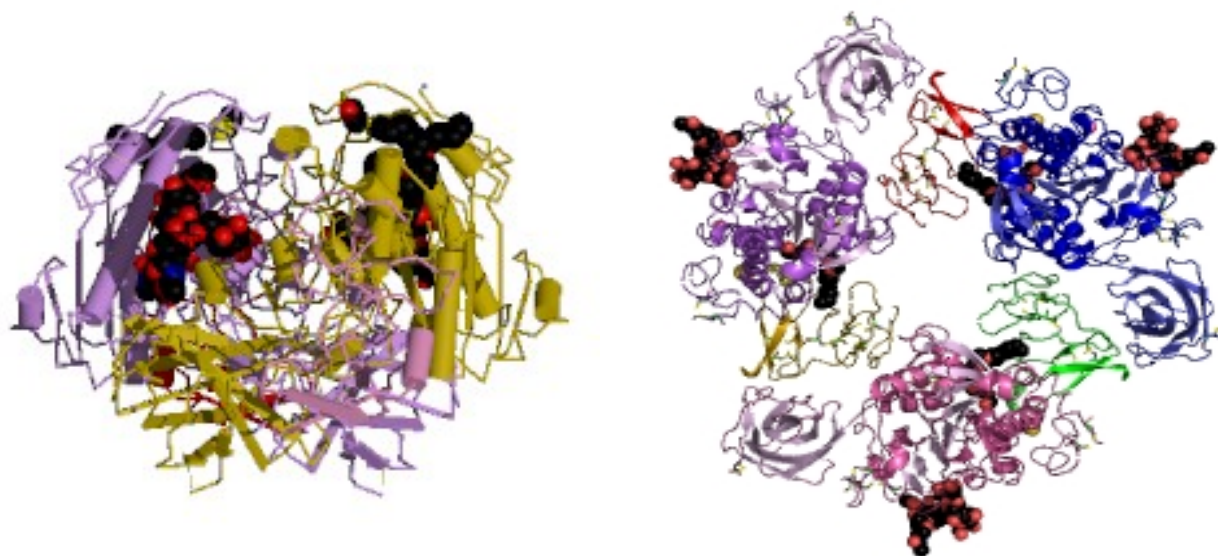


Рисунок 2. Схематическое изображение СФС из молекул субстрата (в виде моделей Стьюарта) и димера (слева) или октамера (справа) комплексов липазы из поджелудочной железы свиньи (Л-1) и колипазы (КоЛ): код **1eth** (PDB-EBI)

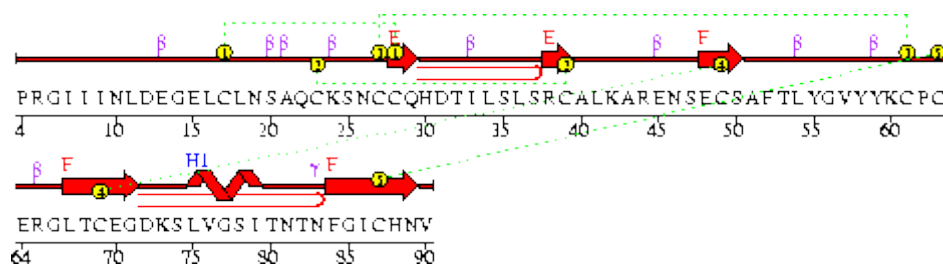


Рисунок 3. Полипептидная последовательность для колипазы из поджелудочной железы свиньи (КоЛ): код 1eth (PDB-EBI)

Инновационная идея СФС [2,14,21-25] исключительно ценна при исследовании структуры и функции многочисленных систем на основе субстрата и Л-1 (*Sus scrofa*, 448 аминокислотных остатков) в комплексе с таким естественным (для желудочно-кишечного тракта животных) регулятором как «колипаза» (КоЛ, 87 аминокислотных остатков), представленных на рисунках 2, 3, 4 и 5 («код 1eth, PDB-EBI» [2]).

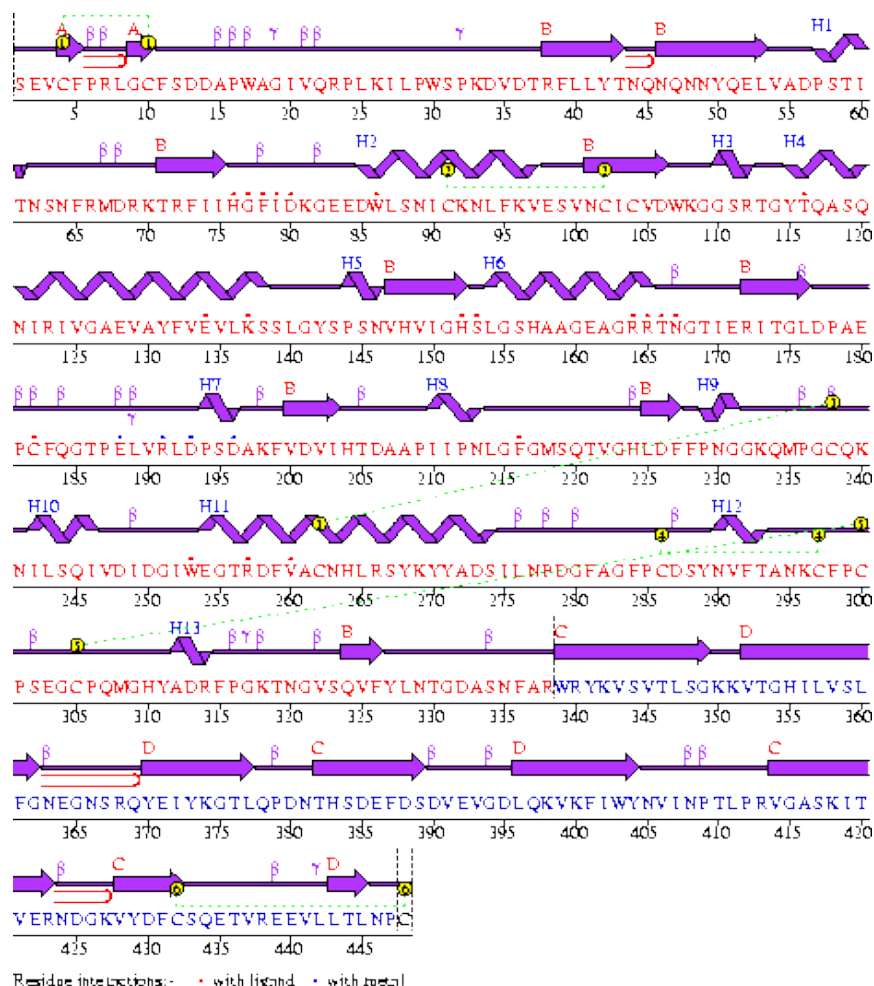


Рисунок 4. Полипептидная последовательность для липазы из поджелудочной железы свиньи (Л-1): код 1eth (PDB-EBI)

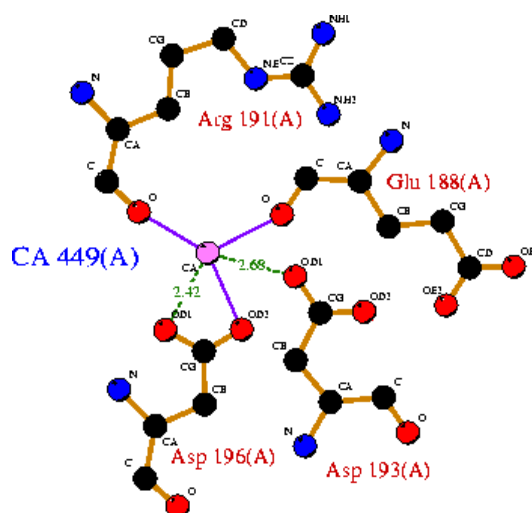
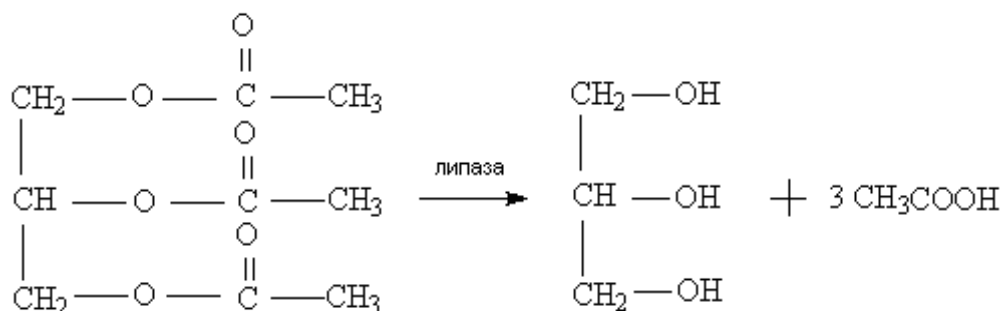


Рисунок 5. Строение Ca^{2+} -связывающего участка липазы из поджелудочной железы свиньи (Л-1): код 1eth (PDB-EBI)

Адекватное структурное представление этой СФС требует (рис. 2-5) дополнительного включения в модель не менее 1071 молекулы воды и, как минимум, один катион Ca^{2+} и т.п. «на каждый комплекс липазы с колипазой» [2, 23], который можно обозначит как «СФС:Л-1-КоЛ». Как известно, СФС:Л-1-КоЛ максимально стабилизируется с использованием «от 96 до 100 различных контактов» между 16 и 12 АКО (в этих двух белках), а минимально – около 15 «различных контактов» между четырьмя АКО «с каждой стороны» (Рис. 4 и 5) [2]. Причем организация «каталитического центра» СФС:Л-1-КоЛ (минимально из трех АКО: **Ser153**, **Asp80** и **Gly77**) существенно отличается от «субстрат-связывающего центра» Л-1 (Рис. 4 и 5) [2, 23].

Как известно, СФС:Л-1-КоЛ, в отличие от других ферментов, эффективно действует на ТАцГ только «при его нахождении в эмульгированном состоянии, т.е. с увеличенной поверхностью взаимодействия» [2], т.к. именно в этом состоянии [30-33] субстрат быстро и количественно расщепляется на минимальные метаболические блоки («глицерол, насыщенные и/или ненасыщенные жирные кислоты» [2]), что отражено в нижеследующей реакции [30]:



Как в фундаментальном аспекте, так и в прикладных направлениях широко используются липаза Л-1 и липазы из различных бактерий и грибов, например, *Pseudomonas fluorescens* (Л-2), *Mucor javanicus* (Л-3) и других природных источников [23, 34-39]. Для этих липаз было обнаружено наличие двух мест связывания: «широкий карман для глицерола и ацила-2, а узкий – для ацила-1 и ацила-3» [34-39]. Так, Л-1 и Л-2 способны «узнавать энантиомер вторичных спиртов» и, поэтому, демонстрировать «высокую энантиоселективность для вторичных спиртов» [34-39]. Напротив, липаза из *Candida cylindracea* (Л-4) имеет «низкую энантиоспецифичность для спиртов из-за структуры

широкого связывающего кармана» [40]. Интересно, что Л-2 и другой фермент «с протеиназной активностью» уже «запатентованы для использования в производстве сыров» [41].

Гидролиз ТАцГ под действием Л-1, согласно общему мнению энзимологов, подчиняется «уравнению Михаэлиса-Ментен» [23, 34-39]. Тем не менее, необходимо учитывать, что это специфическая гидролитическая реакция, протекающая «на границе раздела фаз» [42]. Важно, чтобы молекула ТАцГ или другого «суперсубстрата» находились в правильной ориентации относительно «субстрат-связывающего центра» молекулы Л-1 для начала реакции [42]. Таким образом, применение концепции СФС для различных типов ферментов (включая Л-1) помогает лучше понять и точнее моделировать условия их работы в организме, что будет обсуждаться ниже.

Структурные характеристики и особенности функционирования СФС на основе липаз. В дополнение к известным схемам супрамолекулярных систем, метаболических процессов и классификации ферментов [14, 21-25] рассмотрим инновационные подходы для создания и исследования супрамолекулярных «ферментных» систем в соответствии с уровнями их структурной организации.

Супрамолекулярная организация липидоподобных субстратов в монослое на границе раздела фаз позволяет создавать «ферментные» **СФС** 1^{го} уровня (**СФС-1**) с более высокой эффективностью катализа по сравнению с известными фермент-субстратными комплексами [23]. Простейшим структурно-функциональным примером **СФС** 1^{го} уровня (**СФС-1**) является ферментативный гидролиз под действием Л-1 комплексных липидоподобных субстратов (КЛПС) «предорганизованных» в монослоях. Взаимодействие липазы с КЛПС приводит к образованию комплекса Л-1... КЛПС на границе раздела фаз. Ряд вопросов этого направления (особенно по **СФС-1**) описаны в работах [14, 21-25, 43-47], однако получение и изучение **СФС** более высоких уровней еще только в начальной стадии работ.

СФС-1 как комплексы липазы и КЛПС в монослое на границе раздела фаз. Важной фундаментальной задачей является рассмотрение **СФС-1** с точки зрения кинетических особенностей ферментативного гидролиза КЛПС (организованных в монослой) под действием Л-1 или Л-2. Для этого оптимальным является использование метода Ленгмюра [23, 45, 48-50]. Методика исследования кинетики гидролиза основывается на определении начальной скорости процесса, подобно подходу, используемому для изучения ферментативных реакций в однородной среде [22-25]. В частности, проводились сравнительные исследования кинетических характеристик гидролиза новых КЛПС – поверхностно-активных производных глицерина, жирных кислот и некоторых аминокислот. Чтобы изучить механизм действия липазы, фермент растворяли в водной фазе, которая находилась в ванне «Ленгмюра» [23, 45], тогда как КЛПС наносили на её поверхность в таком количестве, чтобы образовался мономолекулярный слой. Скорость ферментативного гидролиза определяли по изменению со временем «площади, занимаемой субстратом на границе раздела фаз под определенным давлением» [23].

Среди исследованных «гидрофобных субстратов» были использованы КЛПС – производные валина (Val-PG), лейцина (Leu-PG) и фенилаланина (Phe-PG), которые были синтезированы ранее [23]. В качестве ферментов использовались как Л-2, так и препарат Л-1. При степени превращения КЛПС от 5 до 15% площадь монослоя уменьшалась пропорционально времени, что позволило точно измерить «начальные скорости реакции в широком диапазоне их значений» [23].

Для описания кинетики ферментативного гидролиза липазой псевдоглицеридов в монослое использована оптимальная модель, (рис. 6), а трехмерная структура **СФС-1** показана на рисунке 7. КЛПС занимает объем I, ориентированный в монослое, тогда как

Л-1 распределяется между водной фазой (объемом V) и монослоем (объем I) [2, 23] (рис. 6). В такой модели предполагается, что молекулы Л-1, вступающие в контакт с монослоем КЛПС, сразу формирует **СФС-1** [23]. Автор не рассматривает здесь, как слишком обширный для описания, этап перехода Л-1 в «адсорбированное состояние на монослое» [23], что ранее описывалось нами в известном литературном источнике [34].

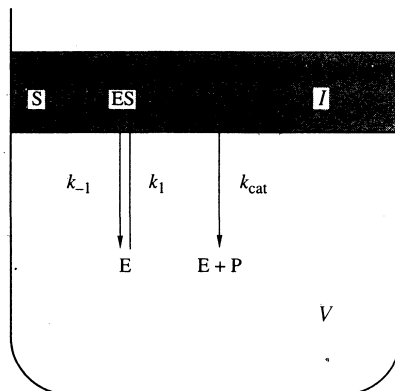


Рисунок 6. Модель, учитывающая все реакции гидролиза ТАцГ и псевдоглицеридов в монослое липазой: I – объем субстрата в монослое, V – объем водной фазы

Нужно принимать во внимание медленную адсорбцию фермента лишь тогда, когда её скорость ограничивает общую скорость ферментативной реакции, что может привести к "предстационарным эффектам": сначала реакция протекает медленно, затем постепенно ускоряется (период задержки) [45]. Однако в описанных выше подходах эти эффекты практически отсутствуют, что является большим достижением, т.к. существенно упрощает представленную модель. Другим важным позитивным отличием предлагаемой модели является то, что концентрация КЛПС (как обобщенный пример «субстрата») в монослое учитывается в объемных единицах, а не как «количество молекул на единицу площади монослоя» [45, 46, 50], что позволяет сопоставление полученных данных [23]. Кроме того, объём монослоя КЛПС, в котором происходит взаимодействие с Л-1, значительно меньше объёма водной фазы в ванне «Ленгмюра» [45]. С учетом всех этих допущений было предложено уравнение (1) [23], которое принимает следующий вид:

$$v_0 = k_{cat}[E]_0(1-k)\frac{V}{I} \quad (1)$$

В условиях низких концентраций Л-1 величина k_{cat} (константы ферментативного гидролиза) была определена с использованием уравнения (1), а $K_{M(каж)}$ (эффективной константы Михаэлиса) – по уравнению (2):

$$K_{M(каж)} = \frac{[S]_0 - [S]_0(1-k)}{(1-k)\frac{V}{I}} = \frac{k[S]_0}{1-k} \frac{I}{V} \quad (2)$$

Таблица 1. Концентрации трилаурина и псевдоглицеридов в монослоях и кинетические параметры их ферментативного гидролиза липазой Л-1

Субстрат	$[S]_0$, М	$k_{кат}$, с ⁻¹	$K_{M(каж)}$ 10 ⁻⁶ , М
Трилаурин	0,97	4±1	1,9±0,2
Phe-PG	0,81	11±1	1,7±0,2
Leu-PG	0,94	7±1	1,9±0,2
Val-PG	0,97	13±1	2,0±0,2

На основе данных таблицы 1 можно сделать вывод, что значения «каталитических констант ферментативного гидролиза ($k_{кат}$)» [11-13] достаточно хорошо совпадают с константами, полученными ранее для определенных «эмульгированных субстратов» [23]. Так, например, $k_{кат} = 5 \text{ с}^{-1}$ и $K_{M(каж)} = 2,6 \cdot 10^{-6} \text{ М}$ при гидролизе трибутирина в водно-спиртовой эмульсии с «липазой *Rhizopus oryzae*» [41, 45]. При этом стоит отметить, что на величину указанных кинетических констант значительное влияние оказывают степень «эмульгирования субстрата» [23]. Без эмульгатора значение $k_{кат}$ уменьшается, а $K_{M(каж)}$ увеличивается относительно указанных значений. Сравнивая указанные константы с «литературными данными» [23, 41, 45], продемонстрирована общая тенденция изменения ключевых величин, полученных «разными методами» [23].

Более высокие значения каталитической константы $k_{кат}$ в случае любых «1,3-дилаурилпсевдоглицеридов» (по сравнению с трилаурином) можно связать с ключевыми элементами их структуры, а именно: АМО во второй позиции молекулы ТАЦГ и, соответственно, частичное «протонирование» NH_2 -группы до NH_3^+ -группы даже «при нейтральных рН» [23]. Важно отметить, что создание концепции высокоэффективных **СФС-1** впервые позволило подойти к решению принципиальных проблем изучения «ферментативных реакций», протекающих в монослоях, т.е. «двумерных наноразмерных системах на границе раздела фаз» [23].

Взаимодействие липазы с ПАВ как СФС 2^{го} уровня. Следующей задачей является включение липазы в комплексы с рядом поверхностно-активных веществ (ПАВ) как СФС 2^{го} уровня (**СФС-2**), что может приводить как к ингибированию, так и активации фермента в комплексе фермент-ПАВ. Этот подход важен для получения стабильных препаратов иммобилизованной липазы с регулируемой активностью.

Например, в поисках новых пищевых добавок против ожирения, в 2019 году J.U. Park et al. [51] провели большое исследование корейских лекарственных растений и их активных компонентов для определения новых источников ингибиторов Л-1. Так, среди 34 видов «метанольных сырых экстрактов» именно *Polygonum aviculare* L. продемонстрировал наибольшую ингибирующую активность по отношению в Л-1 (63,97% ингибирования). С помощью многоступенчатого фракционирования и анализа жидкостной хроматографией с масс-спектрометрией (ЖХ/МС) авторы выявили 4 основных соединения (флавонол-3-О-гликозиды, флавонол-3-О-(2"-галлоил)гликозиды и флавонол-агликоны) в качестве наиболее активных ингибирующих компонентов для Л-1. Константы связывания с Л-1 для кверцетина, кемпферола, мирицитрина, кверцитрина и авикулярина составляли: $3,57 \times 10^4$, $2,07 \times 10^4$, $1,45 \times 10^4$, $1,00 \times 10^4$ и $0,94 \times 10^4 \text{ М}^{-1}$, соответственно. Эти значения полностью соответствовали порядку значений для ингибирующей активности Л-1: «кверцетин > кемпферол > мирицитрин > кверцитрин > авикулярин» [51].

Однако, при анализе влияния этих 4 соединений на вторичную структуру Л-1 не было обнаружено больших расхождений по сравнению с контролем [52-54]. Как известно [52-54], состав регулярных структур Л-1 был следующим: α -спираль (18,7%), антипараллельный β -лист (33,0%), параллельный β -лист (12,8%), β -виток (20,0%), а остальное – нерегулярные

структуры. Показано, что все эти 4 соединения уменьшали процент каждой из регулярных структур Л-1 и суммарно увеличивали нерегулярные структуры Л-1. Таким образом, хотя влияние этих соединений на вторичную структуру Л-1 было небольшим, по мнению авторов [51], именно эти несколько процентов изменений в составе регулярных структур Л-1 были существенными для ингибирования фермента.

Детально изучено влияние на активность липазы Л-1 таких более простых ПАВ, как: цетиламин ($C_{16}NH_2$), N-цетилацетамид ($C_{16}AA$), цетиловый спирт ($C_{16}OH$) и 1,2-гексадекандиол (HDD). Найдено, что увеличение количества HDD в **СФС-2** улучшает эффективность иммобилизации Л-1 до 85%, но при этом гидролитическая активность **СФС-2** падает минимально при весовом соотношении компонентов (липаза:HDD) равном 10:1. Однако, Л-1 в составе этих комплексов в 6 раз более активна (по сравнению с исходным ферментом) «в реакции этерификации 1-(R,S)-фенилэтанола винилацетатом в трет-бутилметилом эфире» (рис. 7); причем взаимодействие идет исключительно с «R-формой спирта, обеспечивая энантиомерную чистоту продукта реакции свыше 99%» [23].

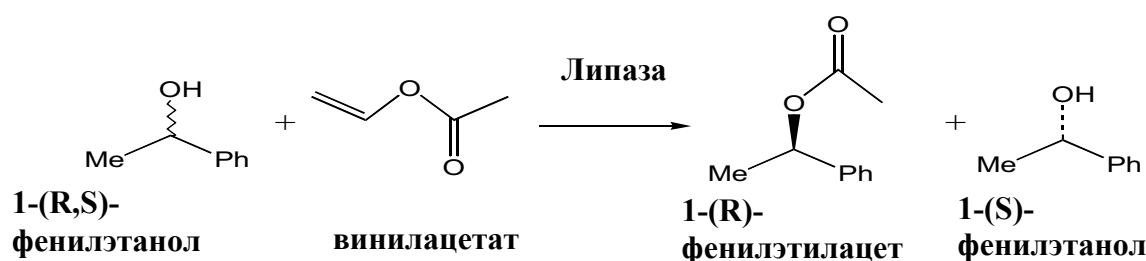


Рисунок 7. Определение этерификационной активности липазы Л-1 в стандартной модельной реакции (адаптировано из [23])

Исследование воздействия поверхностно-активных веществ (ПАВ) на активность липазы выявило, что максимальная интеграция Л-1 (свыше 99%) в **СФС-2** происходит при применении $C_{16}NH_2$ (табл. 2). Это явление может быть объяснено участием электростатических взаимодействий между положительно заряженными аминными группами $C_{16}NH_2$ и отрицательно заряженными (при нейтральном pH) молекулами фермента, поскольку их «изоэлектрическая точка равна 4,46» [23]. Уровень гидролитической активности липазы в **СФС-2** определяется природой используемого ПАВ и снижается в следующем порядке: «HDD > $CeNH_2$ > $CeAA$ > $CeOH$ > PBMA» [23], что, конечно, имеет перспективы практического использования.

Таблица 2. Ферментативная активность Л-1 (А) в СФС-2 с различными ПАВ и степенью иммобилизации липазы (%)

Тип ПАВ	Степень иммоб., %	А [#]	
		Гидр.А	Этер.А
$CeAA$	65	24,0±0,1	19,00±0,09
$CeNH_2$	99	30,0±0,2	13,60±0,08
HDD	85	58,8±0,2	9,30±0,05
$CeOH$	80	18,0±0,1	2,50±0,01
PBMA	90	5,5±0,1	2,90±0,02

Примечание: [#] в mM продукта в час⁻¹ (мг фермента)⁻¹; Гидр.А – гидролитическая активность; Этер.А – этерификационная активность

В ходе использования **СФС-2** «в реакции ацетилирования 1-(R,S)-фенилэтанола винилацетатом» было обнаружено увеличение ферментативной активности (А) по сравнению с исходным ферментом «до 52,0 мМ час⁻¹ (мг фермента)⁻¹ (гидр.А) и 1,53 мМ час⁻¹ (мг фермента)⁻¹ (этер.А)» [23]. Так, этер.А комплексов липазы снижается в следующем порядке ПАВ (табл. 2, рис. 8): «СеАА > СеNH₂ > HDD > PBMA > СеОН» [23]. Было также установлено, что фермент в **СФС-2** в значительной степени «сохраняет свою энантиоселективность в реакции этерификации 1-(R,S)-фенилэтанола винилацетатом» [23].

Кроме того, обнаружено, что **СФС-2** «сохраняют более 95% своей каталитической активности в реакции этерификации после хранения свыше 24 месяцев при температуре 6°C» [23]. Помимо оптимальных гидр.А и этер.А, а также высокой стабильности **СФС-2** их важным преимуществом является относительно низкая стоимость, что делает их более привлекательными по сравнению с «редкими и сложными липидоподобными ПАВ» [23]. Ещё одним положительным аспектом всех этих **СФС-2** является лёгкость их извлечения из реакционной среды, что позволяет повторно «использовать их на практике» [23].

В работе [10] для иммобилизации липазы (Л-1) использовали поверхностно-активные амины и амиды типа: додециламин (C₁₂NH₂), цетиламин (СеNH₂), октадециламин (C₁₈NH₂), N-додецилацетамид (C₁₂АА), N-цетилацетамид (СеАА), N-октадецилацетамид (C₁₈АА). Интересно, что использование C₁₂NH₂ или СеNH₂ приводит к включению Л-1 в **СФС-2** на максимальном уровне (до 99%) [10]. Увеличение длины алкильной цепи снижает степень включения Л-1 «до 80% для C₁₈NH₂» [10] (табл. 3).

Таблица 3. Ферментативная активность (А) липазы Л-1 в комплексах с ПАВ, имеющих различную длину гидрофобного радикала, с учетом степени иммобилизации липазы в комплексы (%)

Тип ПАВ	Степень иммоб., %	Активность [#]	
		Гидр.А	Этер.А
N-алкилацетамиды			
C ₁₂ AA	87.4	23,9±0,1	3,50±0,01
CeAA	87.0	24,0±0,1	19,00±0,09
C ₁₈ AA	86.5	21,8±0,1	4,70±0,02
N-алкиламины			
C ₁₂ NH ₂	>99	21,8±0,1	3,52±0,01
CeNH ₂	>99	30,0±0,2	13,60±0,08
C ₁₈ NH ₂	80	83,2±0,4	11,40±0,06

Примечание: [#] - в мМ продукта в час⁻¹ (мг фермента)⁻¹

Основной движущей силой такой высокой иммобилизации Л-1 в эти ПАВ является электростатическое притяжение разноименно заряженных компонентов **СФС-2**. В присутствии «N-алкилацетамидов» (табл. 3) увеличение значений Этер.А **СФС-2** наиболее значительное в ряду: C₁₈NH₂ < СеNH₂, < СеАА (в ~8-12 раз), тогда как для C₁₂АА, C₁₂NH₂ и C₁₈АА его увеличение менее значительно (в 2-3 раза) по сравнению с Этер.А исходной Л-1 [10]. Удивительно, что увеличение значений Гидр.А **СФС-2** наблюдается только для C₁₈NH₂ по сравнению с Гидр.А исходной Л-1 [10]. Для сравнительной оценки степени включения фермента в **СФС-2** была измерена активность Л-1 как в смешанных монослоях, так и в субфазе (таблица 4).

Таблица 4. Сравнительные данные по активностям (A_1 , A_2 , A_3 , A_4) липазы в растворах, смешанных монослоях липаза-ПАВ и в объеме ванны Ленгмюра после адсорбции фермента в монослой[#]

Тип ПАВ	A_1 Е	A_2 Е	A_3 Е	A_4 Е	A_4/A_3 Е
CeNH ₂	94	62,4	31,6	47,0	1,5
CeAA	100	78,3	21,7	69,0	3,1
HDD	96	85,8	10,2	111,0	11,0
CeOH	100	93,6	6,4	62,4	9,8

Примечание: [#] - где A_1 – начальная активность раствора липазы с концентрацией 100 мкг/л, Е (в нмоль *p*-нитрофениланиона $\cdot \text{ч}^{-1} \cdot (\text{мл раствора фермента})^{-1}$); A_2 – активность в объеме ванны Ленгмюра, Е; A_3 – активность в монослоях, рассчитанная в предположении об отсутствии активации липазы ($A_3 = A_1 - A_2$), Е; A_4 – наблюдаемая активность в смешанном монослое, Е; A_4/A_3 – кажущаяся активация липазы в монослое

С учетом количества Л-1 и ПАВ в монослое и субфазе [10], а также данных таблицы 4 следует, что на каждую молекулу фермента приходится «около ~290 молекул CeNH₂, ~530 молекул CeAA, ~1000 молекул 1,2-гексадекандиола (HDD), ~1700 молекул цетилового спирта (CeOH)» [10, 23]. При этом наблюдается увеличение активности **СФС-2** в ряду: «HDD ≥ CeOH > CeAA > CeNH₂» [10], что соответствует активации Л-1, происходящей на поверхности такого рода ПАВ за счет конформационных изменений в структуре активного центра липазы.

Таким образом, иммобилизация и активация липаз в **СФС-2** (как «гетерогенных системах») существенно зависит как от структурно-функциональных характеристик самих ПАВ («наличие или отсутствие заряженных функциональных групп, длина гидрофобного радикала, взаимодействие с водными и органическими растворителями» [23]), так и их монослоев (особенности организации, их способность к структурным перестройкам и другие).

Принципиально другим примером **СФС-2** может служить включение липаз в «ионные жидкости» (ИЖ) [55] (Рис. 8).

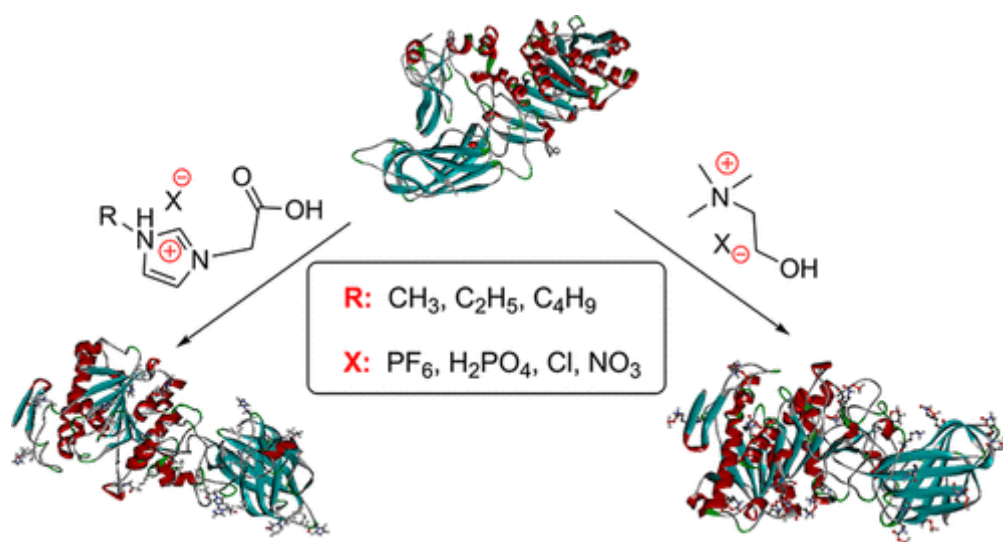


Рисунок 8. Модельные реакции для определения каталитической эффективности после модификации липазы ионными жидкостями (адаптировано из [55])

Корреляция между каталитической эффективностью липаз и модификацией в ИЖ получена на основе каталитических и спектроскопических данных [55]. Причем показано улучшение каталитических характеристик ПЛС (рис. 8). Гидролитическая активность ПЛС усиливалась ИЖ с «хаотропными» катионами и «космотропными» анионами (например, более чем в 4 раза с «[холином][H₂PO₄]]» [55] (рис. 8). Модификации с помощью ИЖ (рис. 8) способствуют термостабильности и энантиоселективности липазы (например, модификация с помощью «[HOOCBmIm][Cl]» показала 12-кратное увеличение термостабильности при 60°C и более чем 7-кратное повышение энантиоселективности по сравнению с нативным ферментом) [55]. Конформационные изменения при связывании липазы с ИЖ были подтверждены методами флуоресцентной спектроскопии и спектроскопии кругового дихроизма [55], что является большим шагом в создании **СФС-2** для практического использования.

Создание и исследование ферментативной активности СФС 3^{го} уровня. Создание СФС 3^{го} и 4^{го} уровней с заданным влиянием полимерного окружения (ПАМА и ПСС) на свойства Л-1 явилось главной задачей данного раздела работы (Табл. 5).

Таблица 5. **Относительная активность (А[#], %) липаз из поджелудочной железы свиньи (Л-1), *P. fluorescens* (Л-2), *M. javanicus* (Л-3) в комплексах с полимерами (ПАМА и ПСС)[#] при соотношениях полимер:липаза от 1:1 до 100:1 (М/М)**

Состав СФС-3		А при 1:1, %	А при 10:1, %	А при 100:1, %
ПАМА [#]	Липаза Л-2	95±2**	102±7*	90±7*
	Липаза Л-1	73±8*	94±7*	44±4*
	Липаза Л-3	96±5*	108±7*	106±8*
ПСС [#]	Липаза Л-2	126±2**	111±7*	94±6*
	Липаза Л-1	23±9	117±9*	115±9*
	Липаза Л-3	152±7*	63±7*	108±5*

Примечание: [#] - где А – активность комплексов липазы с полимерами в % относительно активности этой липазы в растворе без полиэлектролитов (принятой за 100%); [#]ПАМА поли(диаллилметилцетиламмоний) и [#]ПСС – поли(стиролсульфонат)

Согласно полученным данным (табл. 5) для каждой из липаз обнаружен свой спектр активности каждой из липаз в зависимости от соотношения полимер:липаза. Например, в случае ПАМА наибольшая активность каждой из липаз зафиксирована «при соотношении липаза:полимер, равном 1:10» [23]. Это связано с оптимальным соотношением липаза:полимер в **СФС-3** при взаимодействии положительно заряженных молекул ПАМА и отрицательно заряженных молекул липазы (при нейтральных значениях pH).

В целом присутствие ПАМА незначительно изменяет активность липаз Л-2 и Л-3, тогда как в случае Л-1 при крайних соотношениях липаза:полимер (1:1 и 100:1) активность панкреатической липазы уменьшается значительно (на 27% и 56%), что связано как со значительными отличиями в структуре Л-2 и Л-3 липаз по сравнению Л-1, так и особенностями связывания липаз с избытком ПАМА в структуре **СФС-3**.

С другой стороны, в присутствии ПСС в структуре **СФС-3** каждая из липаз вела себя настолько разнопланово, в части не только ингибирования, но и активации (табл. 5), что пока невозможно сформировать общий взгляд на эту систему. Единственное заключение можно сделать о том, что активность липаз значительно варьирует в зависимости от заряда полимера и его концентрации по отношению к ферменту, так как взаимодействие с полиэлектролитами в структуре **СФС-3** может стабилизировать определенную ферментную конформацию, которая либо способствует, либо препятствует катализу. Эти общие соображения хорошо согласуются с изменениями в структуре связывающих центров в

нативных комплексах «липаза-колипаза на границе липидной мицеллы» [23] при сохранении общей организации активного центра всех липаз, состоящего «из остатков серина, гистидина и аспарагиновой кислоты (Сер-Гис-Асп)» [56]. Эти соображения еще больше утверждают автора во мнении о разумности рассматривать многообразные комплексы липаз с полимерами как **СФС** 3^{го} уровня организации и необходимости обязательно учитывать влияние среды (например, неорганических солей) на их активность (табл. 6).

Таблица 6. **Активность (А, %) липазы Л-1 в комплексе с полимерами (ПСС или ПАМА) и в присутствии неорганических солей**

Типы Полимеров	Полимер: Липаза	А, % 10 мМ КН ₂ РО ₄	А, % 1 М NaCl
ПСС	1 : 1	90±3**	98±4*
	10 : 1	142±7**	122±6**
	100 : 1	100±5*	108±6**
ПАМА	1 : 1	102±5*	92±4*
	10 : 1	127±6**	129±6**
	100 : 1	104±5*	105±5*

На основании данных таблицы 6 можно сделать вывод, что активность липазы Л-1 в присутствии любого ПЭ и неорганических солей (NaCl, КН₂РО₄) существенно возрастает при мольном соотношении полимер:липаза 10:1 (табл. 6), которое оптимизировано выше (табл. 5) именно для «свиной липазы» [23]. Эффект влияния указанных выше фосфатов и хлоридов щелочных металлов на активность Л-1 в структуре **СФС-3** напрямую связан с процессами мицеллообразования субстратов, что позволяет управлять липолитической активностью фермента в заданном направлении путем изменения «полимерно-ионного окружения липазы» [56, 34] и температуры.

Создание и исследование ферментативной активности СФС 4^{го} уровня. В ряде работ [34-39] описаны условия образования и свойства сложных **СФС** через механизмы электростатического взаимодействия между синтетическими полиэлектролитами (ПЭ), включая фермент-ПЭ. Детальное изучение комплексов двух типов разнозаряженных ПЭ (ПЭ2) с ферментом (липазой или трипсином) как **СФС** 4^{го} уровня (Табл. 7) являлось следующим шагом для создания модельных физико-химико-биологических систем и «биоматериалов с комплексом заданных свойств» [20-28, 43-50, 57-59].

Таблица 7. **Динамическое поверхностное натяжение (ДПН) и ферментативная активность Л-1 (А, % от исходной активности липазы – 40 Е/мл) в ПЭ2[#] комплексах и Л-1 с ПЭ2 =1:100**

№	рН	ПСС:ПАМА (ПЭ2 [#])	Л-1:ПЭ2	ДПН _{мин.} , мН/м	А _{об} [*] , %
1	9	1:0,3	1:50	50	72
2			1:100	53	72
3	9	1:0,6	1:50	63	67
4			1:100	57	92
5	9	1:1	1:50	57	86
6			1:100	50	125
7	11	1:0,3	1:50	52	-
8			1:100	48	-
9	11	1:0,6	1:50	57	99
10			1:100	45	104
11	11	1:1	1:50	42	131

12		1:100	35	145
----	--	-------	----	-----

Примечание: * A_{06} липазы Л-1 (% от исходной активности этой липазы – 40 Е/мл), #ПЭ2 – комплексы ПСС и ПАМА (ПЭ2)

В таблице 7 приведены основные параметры для ряда **СФС-4**, состоящих из ПСС, ПАМА и Л-1. Если говорить о значениях pH, которые являются критическими для формирования комплексов ПЭ и далее **СФС-4**, то максимальная активность Л-1 наблюдалась при образовании комплекса ПЭ при pH от 9,0 до 11,0 (табл. 7), что несколько превышает pH-оптимумом липазы (pH 8,0-9,0). Причем, **СФС-4** практически не собираются в комплексы в кислой, нейтральной или очень сильно щелочной области. При этом липаза активируется в поликатион-полианионной системе вследствие образования относительно крупных частиц комплекса, что подтверждает измерениями светорассеяния и динамического поверхностного натяжения (ДПН). Это можно объяснить увеличивающейся способностью липаз активироваться на поверхности раздела фаз. В целом, из сравнения литературных и собственных данных автора оптимальное **СФС-4** образуется при следующих соотношениях: 1) полимеры 1:1 (ПЭ2) и 2) Л-1 с ПЭ2 = 1:100 (табл. 7).

Помимо высокой общей активности Л-1 (табл. 7) интересными являются полученные минимальные значения ДПН «при длительных временах существования поверхности раздела фаз» [57-59]. Из полученных ранее данных [34, 47, 57-59] следует, что максимальное ДПН водных растворов липазы в области 10^{-7} - 10^{-9} М находится в пределах 70-72 мН/м, что практически соответствует ДПН дистиллированной воды. В присутствии растворов основных солей (а именно, смеси NaCl и CaCl₂, необходимой для измерения ферментативной активности) в этих растворах липазы наблюдается слабое снижение значений ДПН до 67-69 мН/м. Однако, наиболее существенные изменения ДПН до 35-55 мН/м (табл. 7) наблюдаются при образовании **СФС-4**.

Важно, что метод измерения ДПН является интегральным и уникальным для исследования «коллоидных свойств» **СФС** любого уровня и детально описан в работах [34, 47, 57-59].

Закключение. Таким образом, в данном обзоре систематизированы **СФС** в соответствии с уровнями их структурной организации, в которых главным функциональным элементом являются липазы различного происхождения. Простейшим структурно-функциональным примером **СФС-1** является ферментативный гидролиз (под действием липаз) комплексных липидоподобных субстратов (КЛПС) «предорганизованных» в монослоях. Взаимодействие липазы с КЛПС приводит к образованию комплекса липаза...КЛПС, который на границе раздела фаз выполняет функции специальных модификаторов активности фермента, что отнесено к **СФС-1**. Каталитические процессы под действием комплекса липаза...ПАВ можно отнести к **СФС 2^{го}** «уровня организации». Двух- и трехкомпонентные системы из разнозаряженных ПЭ с липазами – уникальные примеры **СФС 3^{го}** и **СФС 4^{го}** уровней. Важно, что результаты, полученные при исследовании **СФС 3^{го}** и **4^{го}** уровня, позволяют разрабатывать новые подходы к структурно-функциональному изучению многих физиолого-биохимических систем и процессов в организме, в том числе к моделированию гидролитических процессов в желудочно-кишечном тракте, крови и других тканей животных. Следующим шагом в этой области должно стать использование подходов компьютерного моделирования в сочетании с искусственным интеллектом, которые были развиты «лауреатами Нобелевской премии по химии за 2024 год» [60]: Дэвидом Бейкером, получившим награду «за вычислительный дизайн белков», а также Демисом Хассабисом и Джоном Джампером — «за предсказание структуры белков» [60].

В практическом аспекте препараты на основе иммобилизованных липаз (в том числе экстракты из поджелудочной железы свиньи) активно используются в профилактике и лечении заболеваний как человека, так и животных. Возвращаясь к рассмотрению животных для использования как биомедицинских моделей в широком плане, следует сделать следующие замечания: 1. Среди всех сельскохозяйственных животных наиболее часто используются для биомедицинских целей свиньи и кролики. 2. Большой проблемой является недостаточное количество «солидных органов» человека для трансплантации в медицине. Одними из решений этой проблемы многими авторами [61-63] рассматриваются методы «ксенотрансплантации» в качестве приемлемого выбора, в частности использование органов свиней («как альтернативного источника органов для человека» [62]). Считается, что свинья ближе других легкодоступных сельскохозяйственных животных к человеку по «анатомии и физиологии пищеварения, сердечно-сосудистой системы, коже, строению глаз, почек» [64] и тому подобных органов и тканей. 3. Современным направлением является использование в биомедицинских опытах не традиционных пород свиней, а мини-свиней. Для этого в развитых странах уже выведены и довольно широко используются специальные породы мини-свиней: «светлогорские» и «минисибс» (РФ), «хормельские», «хенфордские», «питманмурские», «небрасские», «белтсвиллские», «томпсоновские» (США), «геттингенские», «мини-Леве» (ФРГ), «корсиканские» (Франция), «омини» (Япония), «Лисанг» и «ассамские» (Китай) [64]. Перспективным является использование таких мини-свиней [64] как биомедицинских моделей в исследованиях по диагностике и лечению сердечно-сосудистых заболеваний, атеросклероза сосудов, инфарктов, язвы желудка, алкоголизма, ожирения, кожных и других заболеваний, что может быть темой отдельного обзора.

Литература.

1. Hamernik D.L. Farm animals are important biomedical models // *Animal Frontiers*, 2019, V. 9, №3, 3-5. doi: 10.1093/af/vfz026
2. Зайцев С.Ю. Биологическая химия: от биологически активных веществ до органов и тканей животных: монография / С.Ю. Зайцев – Москва: ЗАО «Капитал Принт», 2017. – 517 с.: ил., табл., 500 экз. – ISBN 978-5-9500581-7-2. – Текст: непосредственный.
3. Ireland J.J., Roberts R.M., Palmer G.H., Bauman D.E., Bazer F.W. A commentary on domestic animals as dual-purpose models that benefit agricultural and biomedical research / *J. Anim. Sci*, 2008, V. 86, 2797–2805. doi:10.2527/jas.2008-1088.
4. Humphray S.J., Scott C.E., Clark R., Marron B., Bender C., Camm N., Davis J., Jenks A., Noon A., Patel M. A high utility integrated map of the pig genome // *Genome Biol*, 2007, V.8, R139. doi:10.1186/gb-2007-8-7-r139.
5. Tellam R.L., Lemay D.G., Van Tassell C.P., Lewin H.A., Worley K.C., Elsik C.G. Unlocking the bovine genome // *BMC Genomics*, 2009. V. 10, p.193. doi:10.1186/1471-2164-10-193.
6. Wolf E., Kemter E., Klymiuk N., Reichart B. Genetically modified pigs as donors of cells, tissues and organs for xenotransplantation // *Anim. Front*, 2019, V. 9(3), 13–20. doi:10.1093/af/vfz014.
7. Proudfoot C., Lillico S., Tait-Burkard C. Genome editing for disease resistance in pigs and chickens // *Anim. Front*, 2019, V. 9(3), 6–12. doi:10.1093/af/vfz013.
8. Radcliffe J.S., Brito L.F., Radcliffe J.S., Reddivari L., Schmidt M., Herman E.M., Schinckel A.P. A swine model of soy protein induced food allergenicity: implications in human and swine nutrition // *Anim. Front*, 2019, V. 9(3), 52–59. doi:10.1093/af/vfz025.
9. Зайцев С.Ю. Сравнительная оценка физиолого-биохимических показателей крови ряда пород свиней и их гибридов: монография / С.Ю. Зайцев - Москва: Издательство «Академия Принт», 2024. – 230 с.: табл., 100 экз. – ISBN 978-5-6052475-3-1. – Текст: непосредственный.
10. Горохова, И.В. Изучение каталитических свойств липаз, иммобилизованных в гидрофобных средах 03.00.04 – «Биохимия»: диссертация на соискание ученой степени кандидата химических наук / Горохова, Ирина Викторовна - Москва, 2003, - 129 с.
11. Уайт А. Основы биохимии. / Уайт А., Хендлер Ф., Смит Э., Хилл Р., Леман И. // Пер. с англ. под ред. Ю.А. Овчинникова - М.: Мир, 1985, Т. 1, 534 с.
12. Ovchinnikov Yu. A. Membrane proteins as Light-energy Transducers // *Biopolymers*, 1985, V.24(1), 157-166. doi:10.1002/bip.360240113.
13. Dixon, M. Enzymes inhibition and activation / M. Dixon, E.C. Webb, C.J.R. Thorne, K.F. Tipton // *Enzymes*, 3rd ed. London: Longman, 1979.

14. McDonald A.G., Boyce S., Tipton K.F. ExplorEnz: the primary source of the IUBMB enzyme list // *Nucleic Acids Res*, 2009, V. 37, D593–D597.
15. Kaneko J.J., Harvey J.W., Bruss M.L. Clinical biochemistry of domestic animals / J.J. Kaneko, J.W. Harvey, M.L. Bruss // 6th ed. Amsterdam: Elsevier, 2008, 916.
16. Lawrence, A.K. Classifications and Descriptions of Proteins, Lipids, and Carbohydrates / A.K. Lawrence, K.N. Herbert, A.K. Lawrence Amadeo, J. Pesce // In the "Clinical Chemistry: theory, analysis, and correlation" (eds. L.A. Kaplan, A.J. Pesce, C.S. Kazmierczak) St. Louis: Mosby Company, 2003, 1024-1036.
17. Bairoch A. The ENZYME database in 2000 // *Nucleic Acids Re*, 2000, V. 28, 304–305. doi:10.1093/nar/28.1.304. doi:10.1093/nar/28.1.304.
18. Fahim Y.A., El-Khawaga A.M., Sallam R.M. A Review on Lipases: Sources, Assays, Immobilization Techniques on Nanomaterials and Applications // *Bio Nano Sci*, 2024, V. 14, 1780–1797.
19. dos Santos L.N., Perna R.F., Vieira A.C., de Almeida A.F., Ferreira N.R. Trends in the Use of Lipases: A Systematic Review and Bibliometric Analysis // *Foods*, 2023, V. 12., 3058.
20. Lehn J.M. Cryptates: Inclusion Complexes of Macropolycyclic Receptor Molecules // *Pure Appl. Chem*, 1978, V. 50, 871-892. doi:10.1016/B978-0-08-022007-9.50007-4.
21. Friedrich, P. Supramolecular enzyme organization. Quaternary structure and beyond / P. Friedrich // Budapest: Akademiai Kiado, 1984, 3-61.
22. Овчинников, Ю.А. Биоорганическая химия / Ю.А. Овчинников // М.: Просвещение, 1987. - 815 с.
23. Зайцев, С.Ю. Супрамолекулярные наноразмерные системы на границе раздела фаз. Концепции и перспективы для бионанотехнологий / С.Ю. Зайцев // М.: ЛЕНАНД, 2010, 208 с.
24. Barba-Bon A., Nilam M., Hennig A. Supramolecular Chemistry in the Biomembrane // *ChemBioChem*, 2020, V. 21, №7, 886–910. doi:10.1002/cbic.201900646
25. Антипин И.С. Алфимов М.В., Антипин И.С., Алфимов М.В., Арсланов В.В., Бурилов В.А., Вацадзе С.З., Волошин Я.З., Якимова Л.С. Функциональные супрамолекулярные системы: дизайн и области применения // *Успехи химии*, 2021, Т. 90(8), 1028-1037. doi:10.1070/RCR5011.
26. Shuai W., Das R.K., Naghdi M., Brar S.K., Verma M. A review on the important aspects of lipase immobilization on nanomaterials // *Biotechnology and applied biochemistry*, 2017, V. 64(4), 496-508. doi: 10.1002/bab.1515.
27. Tan T. Lu J., Nie K., Deng L., Wang F. Biodiesel production with immobilized lipase: a review // *Biotechnology advances*, 2010, V. 28(5), 628-634. doi:10.1016/j.biotechadv.2010.05.012.
28. Kılınç A. Teke M., Önal S., Telefoncu A. Immobilization of pancreatic lipase on chitin and chitosan // *Preparative biochemistry & biotechnology*, 2006, V. 36(2), 153-163. doi:10.1080/10826060500533976
29. Zaitsev S.Yu. Savina A.A., Garnashevich L.S., Tsarkova M.S., Zaitsev I.S. Effect of Some Charged Polymers on the Activity of Pancreatic Porcine Lipase // *BioNanoScience*, 2019, V.9(4), 773-777.
30. Mendes A.A., Oliveira P.C., de Castro H.F. Properties and biotechnological applications of porcine pancreatic lipase // *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 2012, V. 78, 119-134. doi:10.1016/j.molcatb.2012.03.004.
31. Garner C.W., Smith L.C. Porcine Pancreatic Lipase // *Journal of Biological Chemistry*, 1972, V. 247(2), 561-565.
32. Vorderwülbecke T., Kieslich K., Erdmann H. Comparison of lipases by different assays // *Enzyme Microb. Technol.*, 1992, V. 14, 631–639. doi:10.1016/0141-0229(92)90038-P.
33. Xiao X., Ross L.E., Sevilla W.A., Wang Y., Lowe M.E. Porcine pancreatic lipase related protein 2 has high triglyceride lipase activity in the absence of colipase // *Biochim Biophys Acta*, 2013, V.1831(9), 1435-41. doi: 10.1016/j.bbali.2013.06.002
34. Zaitsev S.Yu., Savina A.A., Zaitsev I.S. Biochemical aspects of lipase immobilization at polysaccharides for biotechnology // *Advances in Colloid and Interface Science*. 2019, V. 272, 102016. doi:10.1016/j.cis.2019.102016.
35. Meng Z. Wu J., Li Q., Liu Y., Tang A. Effective immobilization of *Candida cylindracea* lipase on surfactant-modified bentonite // *Molecular Crystals and Liquid Crystals*, 2022, V.754(1), 84–97.
36. Akhter K. Karim I., Akhter K., Aziz B., Bibi A., Khan J., Akhtar T. Optimization and characterization of alkaliphilic lipase from a novel *Bacillus cereus* NC7401 strain isolated from diesel fuel polluted soil // *PLoS One*, 2022, V. 17(8), e0273368. doi:10.1371/journal.pone.0273368.
37. Basyaruddin M.A.B. et al, Application of advanced materials as support for immobilization of lipase from *Candida rugosa* // *Biocatalysis and biotransformation*, 2005, V. 23(3-4), 233-239.
38. Xu Y. Huang H., Lu H., Wu M., Lin M., Zhang C., Zhao Z., Li W., Zhang C., Li X., Sun B. Characterization of an *Aspergillus niger* for Efficient Fatty Acid Ethyl Ester Synthesis in Aqueous Phase and the Molecular Mechanism // *Front. Microbiol.*, 2022, V. 12, 820380. doi:10.3389/fmicb.2021.820380.
39. Ereemeev N.L. Zaitsev S.Yu. Porcine pancreatic lipase as a catalyst in organic synthesis // *Mini-Reviews in Organic Chemistry*, 2016, V. 13(1), 78-85. doi:10.2174/1570193X13666160225000520.
40. Hult K., Holmquist M. Molecular Modeling and Synthetic Applications with Microbial Lipases // *Methods in Enzymology*, 1997, V. 286, 386-405. doi:10.1016/S0076-6879(97)86020-X.

41. Брокерхоф Х. Липолитические ферменты. / Х. Брокерхоф, Р. Дженсен; Под ред. Акад. А.Е. Браунштейна и Е.В. Горячевой // М.: Мир, 1978. – 396 с.
42. Verger R. Interfacial activation of lipases: facts and artifacts // Trends in Biotechnology, 1997, V.15(1), 32–38.
43. Зезин А.Б., Кабанов В.А. Новый класс комплексных водорастворимых полиэлектролитов // Успехи химии, 1982, Т.51(9), 1447–1483. doi:10.1070/RC1982v051n09ABEH002921.
44. Fendler, J.H. Membrane Mimetic Chemistry: Characterizations and Applications of Micelles, Microemulsions, Monolayers, Bilayers, Vesicles, Host-Guest Systems and Polyions. / Fendler J.H. // N.Y.: Wiley-Interscience, 1982, 522.
45. Birdi, K.S. Lipid and Biopolymer Monolayers at Liquid Interfaces / K.S. Birdi // N.Y. & London: Plenum Press, 1989, 325.
46. Ahlers M., Mueller W., Reichert A., Ringsdorf H., Venzmer J., Specific Interactions with Functional Lipid Monolayers - Ways of Simulating Biomembrane Processes // Angew. Chem., Int. Ed. Engl., 1990, V.29, 1269–1285. doi:10.1002/anie.199012691.
47. Zaitsev S.Yu. Dynamic surface tension measurements as general approach to the analysis of animal blood plasma and serum // Advances in Colloid and Interface Science, 2016, V.235, 201–213. doi:10.1016/j.cis.2016.06.007.
48. Zaitsev S.Yu., Solovyeva D.O., Supramolecular nanostructures based on bacterial reaction center proteins and quantum dots // Advances in Colloid and Interface Science, 2015, V.218, 34–47. doi:10.1016/j.cis.2015.01.006.
49. Zaitsev S.Yu., Solovyeva D.O., Zaitsev I.S. Multifunctional membranes based on photosensitive crown-ether derivatives with advanced properties // Advances in Colloid and Interface Science, 2015, V.222, 755–764.
50. Roberts G.G. An Applied Science Perspective of Langmuir-Blodgett Films // Advances in Physics, 1985, V.34(4), 475–512. doi:10.1080/00018738500101801.
51. Park J.Y., Kim C.S., Park K.M. Inhibitory characteristics of flavonol-3-O-glycosides from *Polygonum aviculare* L. (common knotgrass) against porcine pancreatic lipase // Sci. Rep., 2019, V.9, 18080.
52. Wang S.H., Dong S.Z., Zhang R., Shao H.Y., Liu Y. Effects of proanthocyanidins on porcine pancreatic lipase: conformation, activity, kinetics and thermodynamics // Process Biochem, 2014, V.49, 237–243. doi:10.1016/j.procbio.2013.10.018.
53. Wu X., He W., Yao L., Zhang H., Liu Z., Wang W., Ye. Y., & Cao, J. Characterization of binding interactions of (–)-epigallocatechin-3-gallate from green tea and lipase // J. Agric. Food Chem., 2013, V.61, 8829–8835.
54. Raghavendra M.P., Kuma P.R., Prakash V. Mechanism of inhibition of rice bran lipase by polyphenols: a case study with chlorogenic acid and caffeic acid // J. Food Sci., 2007, V.72, E412–419.
55. Jia R., Hu Y., Liu L., Jiang L., Zou B., Huang H. Enhancing Catalytic Performance of Porcine Pancreatic Lipase by Covalent Modification Using Functional Ionic Liquids // ACS Catalysis, 2013, V.3(9), 1976–1983. doi:10.1021/cs400404f.
56. Riddihough G. Picture an enzyme at work // Nature, 1993, V.362, 793.
57. Zaitsev S.Yu. Dynamic surface tension measurements as general approach to the analysis of animal blood plasma and serum // Advances in Colloid and Interface Science, 2016, V.235, 201–213. doi:10.1016/j.cis.2016.06.007.
58. Zaitsev S.Y. Dynamic surface tension parameters of protein–lipid–salt solutions as a system simulating blood plasma // Moscow University Chemistry Bulletin, 2017, V.72(2), 104–109. doi:10.3103/S0027131417020055.
59. Zaitsev S.Y. Interfacial tensiometry method for the analysis of model systems in comparison with blood as the most important biological liquid // Moscow University Chemistry Bulletin, 2016, V.71(3), 205–208. doi:10.3103/S0027131416030111.
60. Портал «Научная Россия»: <https://scientificrussia.ru/articles/nobelevskuu-premiu-po-himii-2024-prisudili-za-predskazanie-struktury-i-vycislitelnyj-dizajn-belkov> (дата обращения 09.10.2024 г.).
61. Александров И.В., Егорова Е.И., Васина Е.Ю., Новиков В.К., Матыко П.Г., Галагудза М.М. Экспериментальные исследования на животных в эпоху трансляционной медицины. Какими им быть? // Трансляционная медицина, 2017, Т.4(2), 52–70. <https://doi.org/10.18705/2311-4495-2017-4-2-52-70>
62. Должиков А.А., Должикова И.Н. Выбор экспериментальной модели в биомедицинских исследованиях имплантатов (обзор) // Научные результаты биомедицинских исследований, 2018, Т.4(3), 49–62. DOI:10.18413/2313-8955-2018-4-3-0-5
63. Гуляев В.А., Хубутия М.Ш., Новрузбеков М.С. Миронов А.С., Олисов О.Д., Луцык К.Н., Журавель С.В., Магомедов К.М., Ахметшин Р.Б., Яремин Б.И. Ксенотрансплантация: история, проблемы и перспективы развития // Трансплантология, 2019, Т.11(1), с. 37–54. DOI:10.23873/2074-0506-2019-11-1-37-54
64. Капанадзе Г.Д. Использование миниатюрных свиней в биомедицинских экспериментах // Биомедицина, 2006, Т.1(2), 40–51.

УДК 636.082

Лиофилизация мужских гамет сельскохозяйственных животных и птиц: достижения, проблемы, перспективы

Курочкин А.А., Притужалова А.О.,
Кузьмина Т.И., Станишевская О.И.

ВНИИГРЖ — филиал ФГБНУ ФИЦ ВИЖ им. Л.К. Эрнста,
Санкт-Петербург, Россия

Аннотация. В настоящее время самым распространенным способом для длительного хранения репродуктивных клеток сельскохозяйственных животных и птиц является технология криоконсервации, которая предполагает хранение образцов в условиях сверхнизких температур. Однако значительные затраты на сохранность образцов и их транспортировку снижают показатели экономической эффективности метода. Лиофилированная сперма может храниться при положительных температурах, и не требует для этого специального оборудования. На данный момент известно, что протоколы лиофилизации позволяют сохранять целостность хроматина сперматозоидов и факторы, детерминирующие активацию ооцитов у грызунов и млекопитающих, а метод интрацитоплазматической инъекции сперматозоида в яйцеклетку (ИКСИ) открывает возможность и перспективы использования «делиофилизованных» мужских гамет в репродуктивных технологиях. В статье представлен обзор литературы по проблеме сохранения спермы сельскохозяйственных животных в состоянии ангидробиоза. Описана история появления метода сублимационной сушки биологических образцов, проблемы предшествующих технологических этапов у разных видов сельскохозяйственных животных, резюмируются достижения и обозначаются тренды технологии лиофилизации мужских гамет животных.

Ключевые слова: лиофилизация, криоконсервация, криобанки, сперма *Gallus gallus*, сперматозоид.

Для цитирования: Курочкин А.А., Притужалова А.О., Кузьмина Т.И., Станишевская О.И. Лиофилизация мужских гамет сельскохозяйственных животных и птиц: достижения, проблемы, перспективы // Успехи наук о животных. 2025. № 1. С. 33—52. doi: 10.25687/3034-493X.2025.2.1.003

Lyophilization of male gametes of agricultural animals and birds: achievements, problems, prospects

A.A. Kurochkin, A.O. Prituzhalova,
T.I. Kuzmina, O.I. Stanishevskaya

All-Russian Research Institute of Genetics and Farm Animal Breeding,
Branch of L.K. Ernst Federal Research Center for Animal Husbandry
Saint Petersburg, Russia

Abstract. Currently, the most common method for long-term storage of reproductive cells for farm animals and birds is cryopreservation technology, which involves storing samples at ultra-low temperatures. However, significant costs for sample's preservation and their transportation reduce economic efficiency of method. Lyophilized sperm can be stored at temperatures above zero and does not require special equipment for this. It is now known that lyophilization protocols make it possible to preserve the integrity of sperm chromatin and factors that determine oocyte activation in rodents and mammals, and method of intracytoplasmic sperm injection into the oocyte (ICSI) opens up possibility and prospects for using "lyophilized" male gametes in reproductive technologies. The article provides a literature review on problem of preserving farm animal's sperm in a state of anhydrobiosis. Described history of the beginning freeze-drying method of biological samples, problems previous technological stages in different types of farm animals, summarized achievements and trends in technology of lyophilization of male animal gametes.

Keywords: lyophilization, cryopreservation, cryobanks, *Gallus gallus* sperm, spermatozoon.

For citation: Kurochkin AA, Prituzhalova AO, Kuzmina TI, Stanishevskaya OI. Lyophilization of male gametes of agricultural animals and birds: achievements, problems, prospects. Ernst Journal of Animal Science. 2025. 1: 33—52. Russian. doi: 10.25687/3034-493X.2025.2.1.003

История создания метода сублимационной сушки биологических образцов.

Одним из перспективных методов длительного сохранения репродуктивных клеток помимо криоконсервации, является лиофилизация или сублимационное высушивание. Данный метод позволяет дегидратировать влагу (воду) из замороженных суспензий (образцов) под действием вакуума, замедляя процессы жизнедеятельности клеток, переводя их в анабиотическое состояние без потери их структурной целостности и биологической активности.

Использование вакуума при низкотемпературной сушке биологических образцов впервые осуществлено Benedict and Manning в 1905 году [1]. Исследования проводили на тканях животных при помощи устройства с химическим вакуумным насосом. [2]. В 1909 году Shackell усовершенствовал метод, добавив к сушильному оборудованию механический вакуумный насос. Им было предложено замораживание образцов в смеси льда с солью с последующим поглощением влаги серной кислотой под вакуумом для высушивания крови и антисыворотки. В 1911 году в совместных исследованиях с Harris R., вышеуказанный метод использовался для сохранения вируса бешенства [3,4.], а затем в том же году Hammer для сохранения жизнеспособных бактерий. Rogers, в 1914 г., с помощью усовершенствованной аппаратуры распространил эту технологию на хранение молочнокислых микроорганизмов. В 1921 году Swift применил тот же принцип высушивания для поддержания стрептококков и пневмококков в исходном состоянии вирулентности, аналогичным образом Elser, Thomas и Steffen уже в 1935 году смогли поддерживать в жизнеспособном состоянии в течение многих лет широкий спектр микроорганизмов, включая менингококки и гонококки. В 1935 году метод был усовершенствован исследователями Flosdorf E. и Mudd S., которые лиофилизировали ткани животных, лекарства, плазму крови и антибиотики. [5,6]. В настоящее время сублимационное высушивание используют при сохранении вакцин, бактерий, вирусов, грибов (дрожжей) и спермы животных [7,8,9,10,11].

Исследования в области лиофилизации спермы животных начались около 70 лет назад. Первая работа опубликована в 1949 году Polge et al. В их экспериментах сперму петухов разбавляли раствором Рингера, содержащим глицерин. Технологические параметры лиофильной сушки, так же как и степень высушивания семени не были опубликованы. Показатели общей активности семени после регидратации составили 50%. Однако, оплодотворяющая способность спермы не была проверена, и авторы ограничились одной работой, не продолжив исследования в данной области [12].

В 1954 г. Jerome K et al. представили анализ различных методов криоконсервации и лиофилизации спермы человека. Описанные ими протоколы лиофилизации не позволили сохранить жизнеспособные клетки после регидратации [13]. Впоследствии этим же коллективом уже в 1957 году было проведено аналогичное исследование, но только на бычьей сперме. Анализ образцов показал, что все клетки после лиофилизации оказались нежизнеспособными [14].

В 1957 году советским ученым Yushchenko N.P. была доказана возможность сохранения спермы млекопитающих в высушенном состоянии. Им были получены живые клетки после регидратации [15]. В 1959 году Meryman H. T. et al. сообщили о получении образцов лиофилизированной спермы быков с 45% общей подвижности и 30% прогрессивной подвижности; искусственное осеменение дало положительные результаты [16]. В последующие годы (1960–1963) исследования продолжились и рядом авторов были также получены сперматозоиды быков с прогрессивной подвижностью после лиофилизации спермы [17]. Более поздние исследования также позволили авторам получить жизнеспособные клетки после регидратации [18,19]. Однако, данные о степени высушивания репродуктивных клеток и уровне остаточной влажности образцов отсутствуют.

Несмотря на то, что ранние исследования сублимационной сушки сперматозоидов показали в некоторой степени обнадеживающие результаты, неудачи с повторением этих экспериментов заставили исследователей по проблеме сублимационной сушки сперматозоидов взять паузу на долгое время. Все изменилось в 1998 году, когда Wakayama et al. получили здоровых мышей путем оплодотворения ооцитов лиофилизированными сперматозоидами с применением метода ИКСИ (intracytoplasmic sperm injection). Кроме того, авторы доказали, что целостность ДНК и факторы активации ооцитов у лиофилизированных сперматозоидов могут сохраняться в течение 3 месяцев при 4°C и в течение нескольких недель при комнатной температуре. Их исследование показало, что наличие неповрежденных носителей генетической информации является необходимым условием, обеспечивающим успех технологии ИКСИ и имеет решающее значение для использования лиофилизированных сперматозоидов млекопитающих [20]. Далее исследования по лиофилизации продолжились с использованием спермы лабораторных животных, в частности мышей и крыс, и начали появляться сообщения о подобных исследованиях на сельскохозяйственных животных.

Проблемы первого этапа технологии сублимационной сушки семени – замораживания – у различных видов животных. Поскольку функциональный статус лиофилизированных сперматозоидов после регидрации в огромной степени зависит от этапа замораживания, предшествующего лиофильной сушке, для получения жизнеспособных клеток необходимо максимально снизить негативное влияние целого ряда факторов, сопутствующих этому процессу (Рис. 1).



Рисунок 1. Этапы лиофилизации спермы

Существует два основных подхода к замораживанию семени: протоколы с медленным охлаждением и протоколы, основанные на витрификации. Оба этих метода нашли широкое применение при криоконсервации спермы животных. Так, например, при замораживании семени птиц методы с быстрым фазовым переходом более предпочтительны, поскольку обеспечивают высокие показатели активности заморожено/оттаянного семени и, как следствие, более высокую фертильность семени [21]. При замораживании семени быков протоколы стандартизированы и основаны на

медленном фазовом переходе, тогда как для других видов, таких как свиньи и лошади, результаты все еще очень изменчивы, и исследования в этой области продолжаются [22].

Протоколы криоконсервации семени как с применением медленного охлаждения, так и витрификации, в разной степени, но неизбежно приводят к повреждениям клетки за счет негативных воздействий больших температурных градиентов и фазового перехода вещества, во время которого образуются кристаллы льда. В результате нарушается целостность плазматических мембран сперматозоидов, акросомный и функциональный статусы митохондрий; структурным повреждениям подвергается ДНК [23, 24]. Повреждение клеток и клеточных мембран, с которым сталкиваются сперматозоиды при быстром охлаждении, связывают с образованием не только внеклеточного, но и внутриклеточного льда. Кроме того, Morris J. et al. представили доказательства того, что при высоких скоростях охлаждения повреждение сперматозоидов является результатом и осмотического дисбаланса [25]. Осмотический дисбаланс возникает в семени при добавлении и удалении криопротекторов, а также при его замораживании и оттаивании [26]. Сперматозоиды подвергаются гипертоническим воздействиям при образовании внеклеточного льда, поскольку концентрация растворенных веществ во внеклеточной незамороженной фракции увеличивается. Это приводит к обезвоживанию клеток из-за переноса воды из клетки для сохранения равновесия между внутри- и внеклеточными концентрациями растворенных веществ. Степень обезвоживания особенно высока, когда для замораживания используются низкие скорости охлаждения. При высоких скоростях охлаждения обезвоживание клеток незначительно, и их гибель вызывается, в первую очередь, образованием внутриклеточного льда [27].

Эксперимент авторов Partyka A. et al. показал, что только около 25% популяции сперматозоидов петухов в конечном итоге переживают процедуру замораживания-оттаивания [24].

Процесс замораживания семени вызывает структурные изменения в ДНК сперматозоидов, фрагментацию хроматина. Предполагается, что основными факторами, потенциально вовлеченными в повреждения на уровне молекул ДНК в процессе замораживания, являются осмотический и окислительный стрессы, возникающие в клетке на этапах пробоподготовки семени и, собственно, его замораживания [23, 28].

Одной из причин деструктивного влияния процесса замораживания на сперматозоиды является повышенная выработка клетками активных форм кислорода (АФК). АФК в сперматозоидах образуются в основном при протекании окислительно-восстановительных реакций, они необходимы для нормальной жизнедеятельности клеток. В малых концентрациях АФК способствуют капацитации сперматозоидов [29, 30], гиперактивации и целостности акросом [31]. Однако, процессы, происходящие при пробоподготовке и замораживании семени, индуцируют образование избыточных АФК в количествах, превышающих антиоксидантную емкость клеток, что оказывает повреждающее воздействие на сперматозоиды [32]. Негативное влияние свободных радикалов и перекисей включает повреждение белков, перекисное окисление липидов плазматических мембран, митохондриальную дисфункцию и повреждение целостности структуры молекул ДНК. Окислительный стресс считается основным механизмом, запускающим криоиндуцированную фрагментацию ДНК сперматозоида [33, 34, 35, 36].

Степень уязвимости репродуктивных клеток самцов всех видов животных к окислительному стрессу и их криоустойчивость в значительной степени зависят от морфологических особенностей сперматозоидов данного вида, липидного состава плазматических мембран сперматозоидов, соотношения холестерина/фосфолипиды в составе липидов и др. [37]. Плазматические мембраны сперматозоидов включают большое количество полиненасыщенных жирных кислот, за счет чего обеспечивается оптимальная

степень их текучести, необходимая для протекания акросомной реакции при взаимодействии с мембраной ооцита. С другой стороны, высокое содержание полиненасыщенных жирных кислот в плазматических мембранах сперматозоидов делает их очень восприимчивыми к процессу липопероксидации и уязвимыми к окислительному стрессу, что особенно проявляется у сперматозоидов птиц [38, 39].

Среды для замораживания спермы и процесс лиофилизации образцов. Среда для разбавления спермы с целью его сублимационной сушки должна представлять собой сбалансированный солевой раствор с соответствующим осмотическим давлением и pH, который легко высыхает и создает хорошую матрицу, обеспечивающую стабильность и легкую регидратацию в дальнейшем. Ни одна среда не способна поддерживать состояние биостаза сперматозоидов в условиях сверхнизких температур одинаково эффективно у всех видов животных [40]. Поэтому при разработке новых составов сред и пропорций компонентов необходимо учитывать видовые особенности сперматозоидов животных.

Olasiregui M. et al. в 2015 году, проводя сравнительный анализ степени фрагментации ДНК сперматозоидов жеребцов, продемонстрировали, что присутствие EGTA (50 мМ) обеспечивает более высокий защитный эффект в отношении ДНК сперматозоидов жеребцов, чем присутствие EDTA (50 мМ) [41].

Nakai et al. в 2007 году исследовали влияние хелатирующих агентов (EGTA, EDTA), ингибирующих активацию таких ферментов, на фрагментацию ДНК в лиофилизированных сперматозоидах хряка. Результаты подтвердили, что фрагментация ДНК в лиофилизированной сперме хряка является одной из причин снижения способности оплодотворенных ооцитов к развитию *in vitro* до стадии бластоцисты, но добавление EGTA в буфер для лиофилизации из расчета 50 мМ EGTA, улучшает эту способность по сравнению с буфером на основе EDTA или полностью без хелатирующего агента [42].

Kusakabe H. et al. в 2001 году также пришли к выводу, что сохранение сперматозоидов мышей путем лиофильной сушки с использованием в качестве разбавителя Трис-HCl буфер, содержащий EGTA (50 мМ) и NaCl (50 мМ), является эффективным средством сохранения линий мышей при низких затратах без наследственных повреждений [43].

Hara H. et al. в 2014 году показали, что модификация состава буфера EGTA (состоящий из 10 мМ Tris-HCl, 50 мМ EGTA и 50 мМ NaCl) путем полного удаления NaCl или добавления трегалозы в финальной концентрации 0,01 – 0,5 (буфер mEGTA), способствовала сохранению структуры лиофилизированного образца спермы быков и поддержанию функционального статуса сперматозоидов за счет увеличения T_g (температура стеклования максимально концентрированной замерзающей фазы) с 0 до 27,7 °C в процессе сушки [44].

Следует отметить, что дисахарид трегалоза занимает особое место, как компонент среды в технологии лиофильной сушки клеток, поскольку способствует повышению температуры фазового перехода в липидных слоях мембран и процессу стеклования. Одними из самых ранних исследований, представивших в 1992 году доказательство того, что трегалоза может стабилизировать клеточные мембраны в процессе ангидриобиоза, были Crowe J.H. et al. [45].

В настоящий момент невосстанавливающие дисахариды широко используются в качестве лиопротекторов для лиофилизации белков и липосомальных систем. Более того, дисахариды уменьшают гидратационные силы, действующие между липидными бислоями в растворе или при замораживании и сушке. Растворенные вещества могут влиять на силы гидратации либо в том случае, если они адсорбируются на границе раздела мембрана-вода, либо, когда они исключены из этой границы [46]. В отличие от типичных криопротекторных соединений, таких как глицерин, ДМСО (диметилсульфоксид) или ДМА (диметилацетамид)

и т.д., сахара могут способствовать достижению стеклообразного состояния воды при комнатной температуре, что является важным защитным свойством при стабильном хранении в высушенном состоянии [47].

Martins C. F. et al. в 2007 году продемонстрировали, что среды TCM 199 с солями Хэнкса, добавлением 10% фетальной телячьей сыворотки и 0,2 М трегалозы и раствора EGTA предотвращали повреждение органелл сперматозоидов крупного рогатого скота, особенно ядер. Среда, используемая для лиофилизации, напрямую влияла на целостность хроматина, обеспечивая лучшую защиту спермы во время сублимационной сушки и при хранении [48].

Men N. T. et al. в 2013 году при добавлении трегалозы в среду для лиофилизации спермы хряков на основе EGTA установили, что ее присутствие в концентрации 15 мМ улучшает целостность структуры ДНК сперматозоидов после выхода из состояния ангидробиоза, но не оказывает влияния на их фертильность и эмбриональное развитие *in vitro* после процедуры ИКСИ [49].

Авторы Stanishevskaya et al. в 2021 году доказали возможность получения регидратированных сперматозоидов петухов, способных к функционированию и, как следствие, к самостоятельному слиянию с яйцеклеткой при искусственном осеменении кур при поэтапном добавлении в среду LCM для лиофилизации спермы трегалозы (9,5 мМ и 1,75М). Ими были сделаны первые шаги по созданию генетического сухого биобанка для домашней птицы [50].

Регидратация и подготовка лиофилизированной спермы для ИКСИ и искусственного осеменения. Регидратация или восстановление — это процесс, используемый для восстановления исходного состава лиофилизированного продукта. Лيوфилизированную сперму обычно регидратируют добавлением воды, объем которой должен быть таким же, как исходный объем суспензии сперматозоидов перед процедурой лиофилизации. После регидратации для разбавления можно использовать любой физиологический солевой раствор, при этом объем разбавления не имеет решающего значения. Перед ICSI важно промыть сперму HEPES-буферной среды, содержащей 12% ПВП, чтобы свести к минимуму введение хелатора кальция (например, EDTA или EGTA) в цитоплазму ооцита, поскольку это может помешать нормальной активации микроинъектированного ооцита [47]. Концентрация сперматозоидов в конечной регидратационной среде должна быть достаточной для облегчения отбора отдельных сперматозоидов для инъекции сперматозоидов в ооциты и достаточной для оплодотворения, если речь идет об искусственном осеменении самок [40].

Повреждение сперматозоидов в процессе лиофилизации. Замораживание и высушивание — разные стрессовые факторы. В отличие от замораживания, сушка приводит к удалению (незамерзающей) воды, обычно связанной с биомолекулами. Как правило, это более критично для биологических образцов, поскольку структура и функция биомолекул зависят от присутствия жидкой воды и взаимодействия с ней. Некоторые белки могут подвергаться необратимым изменениям в своей структуре при высушивании, что приводит к нарушению их работы после регидратации [46]. Кроме того, белки могут участвовать в реакции Майяра с восстанавливающими сахарами, особенно при низком содержании воды [51, 52]. Белки также могут быть расщеплены протеазами, происходящими из лизосом, которые потеряли целостность мембраны во время дегидратации [47].

Осмотический стресс из-за повышенной концентрации растворенных веществ и фазового перехода липидов, когда липиды в клеточной мембране превращаются из жидкой формы в гелеобразную, и слияние мембран наблюдается уже в процессе криоконсервации [28,53]. В процессе сушки наблюдается так же деформация и слияние плазматических

мембран [54]. Во время регидратации происходит лиотропный фазовый переход, когда мембраны снова превращаются из геля в жидкость. Липосомальные системы невозможно высушить без защитных мер. Липосомы и липидные бислои склонны к слиянию во время высыхания и претерпевают лиотропные фазовые изменения мембраны, что приводит к просачиванию водного содержимого через бислой [55]. Лизис клеточных мембран также может быть результатом более быстрого, потока воды обратно в клетки [46].

В клеточной среде биомолекулы гораздо более чувствительны к окислительному повреждению, поскольку АФК и связанные с ними повреждения накапливаются при сушке и последующем хранении. Более того, системы антиоксидантной защиты нарушаются при низком содержании воды, что создает возможности для реакции АФК с биомолекулами. Индуцированное свободными радикалами повреждение проявляется в виде перекисного окисления липидов и дезтерификации фосфолипидов. В результате воздействия АФК на молекулу ДНК индуцируются процессы хромосомных aberrаций, приводящие к нарушению корректной структуры хромосом [56]. Свободные радикалы способны атаковать белки в различных участках, приводя к нарушениям не только первичной, но и вторичной и третичной структуры белков, что приводит к агрегации или фрагментации, обуславливающей дальнейшую потерю функциональной активности биомолекулы [57].

Однако, ДНК и структурные белки, такие как коллаген, относительно устойчивы к повреждающим факторам и часто могут быть высушены без побочных эффектов. Ряд исследователей подтверждают данное утверждение и показывают, что процесс лиофилизации не вносит значимых изменений в целостность структуры ДНК [42, 44, 48, 58].

Хорошо известно, если сохраняется целостность структуры ядерной ДНК, сперматозоиды сохраняют способность к оплодотворению, а поскольку в процессе лиофилизации у сперматозоидов теряется подвижность, жизнеспособное потомство возможно получить с помощью ИКСИ [59]. Действительно, метод ИКСИ уже давно применяется у животных, однако в отношении птиц данная методика пока не применима ввиду особенностей строения яйцеклетки.

Ллиофилизация спермы. Исследователями Polge C. et al. в 1949 году при лиофилизации спермы птиц в течение 3 часов была выявлена общая подвижность спермы после регидратации на уровне 50%, но в статье не приведены данные об использованном протоколе лиофилизации и финальной влажности образца [12].

Авторами Stanishevskaya O. et al. в 2021 было проведено исследование, в результате которого впервые доказана возможность сохранения кинетического аппарата сперматозоидов и их фертильности после лиофилизации. По результатам искусственного осеменения виргинных кур ($n=9$) регидратированным семенем, из 8 снесенных за 1 день сбора яиц было получено 1 оплодотворенное яйцо. При этом при микроскопическом анализе вителлиновой мембраны желтка полученных яиц по методике, разработанной Bakst M. et al [60], все образцы имели точки взаимодействия сперматозоидов с вителлиновой мембраной желтка яиц ($7-37$ шт./см²), что подтверждает сохранность функциональной целостности у части сперматозоидов после лиофилизации [50].

Restrepo G. et al. в 2018 году был проведен сравнительный анализ протоколов криоконсервации спермы жеребцов, предполагающих поэтапную заморозку, витрификацию и лиофилизацию семени. Ллиофилизация спермы проходила в течение 48 часов при 150 мТорр. Авторами было показано отсутствие влияния лиофилизации на структурную целостность молекулы ДНК. Выявлен более высокий процент сперматозоидов с высокой митохондриальной активностью при лиофильной сушке ($40,26 \pm 7,79$ %) по сравнению с замораживанием ($21,82 \pm 5,38$ %) и витрификацией ($5,32 \pm 1,17$ %) ($p < 0,05$). Аналогичным образом, более высокая доля не подверженных перекисному окислению липидов и жизнеспособных сперматозоидов была обнаружена у лиофилизированного семени ($35,98 \pm$

7,01 %) по сравнению с заморожено/оттаянными ($10,34 \pm 2,69$ %) и витрифицированными ($7,07 \pm 2,00$ %) сперматозоидами ($p < 0,05$). Исследователи пришли к выводу, что витрификация приводит к большим изменениям спермы, чем лиофилизация и замораживание [61].

Olaciregui M. et al. в 2015 году при сравнительном анализе трех методов оценки фрагментации ДНК спермы жеребцов после лиофилизации выявили повреждение структуры ДНК у 14,8% клеток [41]. Oldenhof H. et al. в 2017 году изучали возможность проникновения дисахаридов через плазматическую мембрану клеток во время криоконсервации и их роль в сохранении структуры ДНК. Значения индекса фрагментации ДНК (DFI) спермы, лиофилизированной с сахарозой или трегалозой, колебались между 9–11% и 33–52% после 1 и 3 месяцев хранения, соответственно. В заключение авторы констатировали, что лиофилизация сперматозоидов с дисахаридами приводит к их поглощению во время криоконсервации, что значительно снижает деградацию хроматина при хранении в сухом виде [62].

Авторы Hara H. et al. в своем исследовании установили, что различная температура стеклования образцов оказывает разное влияние на сперматозоиды быков в процессе лиофилизации. Фрагментация ДНК в их исследовании при лиофилизации составила $6,3 \pm 0,7$ % [44]. В 2007 году исследователями Martins et al. при комплексной оценке влияния процесса лиофилизации на ультраструктуру, ДНК-фрагментацию и оплодотворяющую способность спермы быков были получены схожие результаты. Фрагментация ДНК составила 7,0%, при этом у всех клеток наблюдались повреждения мембран [48].

Авторами Nakai M. et al. в том же году оценивалось влияние хелатирующих агентов на фрагментацию ДНК лиофилизированных сперматозоидов хряков и дальнейшее развитие ооцитов после ИКСИ. Результаты показали, что фрагментация ДНК на уровне 0,7–4,1% в лиофилизированной сперме снижает способность к развитию инъецированных ооцитов [42].

В исследовании Olaciregui M. et al. в 2017 году оценивалось влияние хелатирующих агентов в сочетании с розмариновой кислотой на показатели лиофилизированной спермы хряков. Фрагментация ДНК составила 0,7–5,1%. В своей работе авторы показали, что добавление розмариновой кислоты в среду улучшает целостность ДНК сперматозоидов после процедуры лиофилизации, но не влияет на оплодотворение и последующее развитие эмбриона до стадии бластоцисты [63].

Авторы Pallazzese L. et al. в 2018 году оценивали фрагментацию ДНК в эпидидимальных лиофилизированных сперматозоидах барана и степень ее влияния на развитие эмбрионов *in vitro*. Фрагментация ДНК составила $87,8 \pm 6$, доля клеток с повреждёнными мембранами составила 99–100%. Стоит отметить, что фрагментация ДНК у эпидидимального семени значительно выше, чем у свежеполученных эякулятов [64]. Авторами Arav A. et al. в том же году была продемонстрирована высокая жизнеспособность сперматозоидов баранов после процесса лиофилизации. После одного часа при давлении в сушильной камере 80 мТорр, общая подвижность спермы составила $46,6 \pm 2,8$ % [65].

Влияние методов криоконсервации и особенностей технологического процесса лиофилизации на качественные показатели спермы и структурную целостность сперматозоидов. Подавляющее большинство авторов акцентирует внимание на целостности структуры ДНК сперматозоидов после процесса лиофилизации. Это объясняется тем, что для метода ИКСИ, как правило используемого для сублимированного семени, наличие полноценной генетической информации является решающим фактором в дальнейшем развитии эмбрионов. Как уже было сказано, в большинстве случаев лиофилизация не оказывает значимого влияния на фрагментацию ДНК. Авторы многих работ констатируют данный факт [42, 44, 48, 58].

Таблица 1. Технологические особенности процесса лиофилизации и характеристики сублимированного семени у разных видов сельскохозяйственных животных при разных методах криоконсервации

Метод криоконсервации спермы	Объем/масса образца	Хранение образцов после лиофилизации	Температура образцов (°C)	Время лиофилизации (ч)	Давление в сушильной камере (мТорр)	Общая / Прогрессивная подвижность (%)	Фрагментация ДНК (%)	Поврежденность плазматических мембран (%)	Ref.	Автор, год
Петух										
МЗ	107 мг	флаконы	-150	2	5	1±0,3 / 0	25	61	50	Stanishevskaya et al., 2021
В	2 мл	100 мл перегонная колба	-25	3	-	50	-	-	12	Polge C. et al., 1949
Жеребец										
МЗ	100 мкл	Вакуумированные флаконы	- 80	48	150	0 / 0	0,02±0,01 DFI	44,17±8,48	58	Restrepo G. et al., 2018
МЗ	150 мкл	Вакуумные пакеты	-30 ^a и 20 ^b	6 ^a и 4 ^b	60 ^a и 10 ^b	-	11–15 DFI	100	62	Oldenhof H. et al., 2017
В	150 мкл	флаконы	-	-	-	-	14,8	-	41	Olaciregui M. et al., 2015
Бык										
МЗ	15 мкл	Вакуумированные флаконы	-30	6	90	-	6,3 ± 0,7	-	44	Hara H. et al., 2014
МЗ	100 мкл	Пробирки объемом 1,5 мл, покрытые алюминиевой фольгой.	-40	12-16	262,5	0	7	100	48	Martins C. F. et al., 2007

Хряк										
МЗ	100 мкл	запаянные стеклянные ампулы (ф 8 mm x 150 mm)	-40	6	-	-	0,7–4,1	-	42	Nakai M. et al., 2007
В	150 мкл	флаконы	-68 ^a и 20 ^b	-	40 ^a и 14 ^b	-	0,7–5,1	-	63	Olaciregui M. et al., 2017
Баран										
МЗ	10 мкл	капли спермы на покровном стекле	-25	1	80	46,6± 2,8	-	-	65	Arav A. et al., 2018
МЗ	100 мкл	Вакуумиров анные ампулы	-50	24	1	-	-	100	66	Anzalone D. A. et al., 2018
МЗ	2 мл (ЭС*)	8 мл пробирки с крышками	-196	24	3,75	0 / 0	87.8 ± 6	99-100	64	Palazzese L. et al., 2018
В	150 мкл	флаконы	-68 ^a и 20 ^b	-	40 ^a и 14 ^b	-	2,9–4,4	-	67	Olaciregui M. et al., 2017

Примечание: ^a – Давление и время первичной сушки, ^b – Давление и время вторичной сушки, МЗ – протоколы криоконсервации, предполагающие поэтапное снижение температуры образцов, В – витрификация, ЭС – эпидидимальная сперма, DFI – индекс фрагментации ДНК

Проследить влияние технологических процессов лиофилизации, таких как время, давление вакуума, первичная и вторичная сушка достаточно сложно ввиду немногочисленности работ и противоречивости некоторых данных. Так, у двух групп исследователей были получены схожие данные по фрагментации ДНК у сперматозоидов быков после лиофилизации, при этом время лиофильной сушки и давление в сушильной камере значительно различалось - 6 часов и 90 мТорр у авторов Hara H. et al. [44], и 12-16 часов и 262,5 мТорр у Martins C. F. et al. [48].

У баранов Anzalone D.A. et al. и Palazzese et al. в 2018 и 2017 годах при сушке спермы в течение 24 часов и давлении в сушильной камере 1-3,75 мТорр получили разные результаты по развитию эмбрионов *in vitro* (таблица 1) [64, 66, 67].

При лиофилизации спермы хряков авторами Nakai M. et al. в 2007 году время сушки составило 6 часов, а температура образцов -40 °С [42], фрагментация ДНК сперматозоидов колебалась в пределах 0,7-4,1%. У авторов Olaciregui M. et al в 2017 году при других настройках лиофильной сушки и при поэтапном снижении вакуума и повышении температуры, фрагментации ДНК сперматозоидов хряков составила 0,7% [63].

У птиц представлено лишь две работы на данный момент по лиофилизации спермы и одна из них проведена в 1949 году, поэтому о влиянии параметров сушки и методов криоконсервации говорить пока не представляется возможным.

Использование лиофилизированного семени в репродуктивных технологиях.

Лабораторные животные. Большинство исследований по сохранению спермы в сухом виде, и оценке ее оплодотворяющей способности в дальнейшем на сегодняшний день были сосредоточены на сперматозоидах грызунов, и небольшое количество исследований было проведено на видах млекопитающих, не являющихся грызунами (Таблица 2). В большинстве работ по использованию лиофилизированной спермы используется метод интрацитоплазматической инъекции сперматозоида (ИКСИ) непосредственно в ооцит. Данная технология решает проблему почти полного снижения общей подвижности спермы после регидратации и позволяет получать от нее в дальнейшем потомство.

Первые успешные опыты на мышах были проведены учеными Wakayama et al. в 1998 году [20]. Им удалось получить жизнеспособное потомство после подсадки эмбрионов к реципиенту. В 2017 году Ito D. et al использовали лиофилизированное семя мышей, которое находилось на международной космической станции в течение 9 месяцев. Из 1317 оплодотворенных ооцитов они получили 116 зародышей, при этом доля эмбрионов на стадии дробления составила 59,5% [68]. В 2021 году авторами Wakayama et al. был предложен способ транспортировки лиофилизированного семени с использованием почтовой доставки, что может существенно упростить этот процесс, и способствовать сохранению генетических ресурсов тысяч линий мышей [69].

В работе Kamada et al. в 2018 году было показано снижение оплодотворяющей способности лиофилизированного семени мышей *in vitro* в зависимости от времени ее хранения. Так, при использовании ее на следующий день после высушивания из 275 ооцитов удалось получить 52 эмбриона, с долей эмбрионов, начавших стадию дробления – 77,8%. В случае, когда сублимированное семя хранилось год, и затем использовалось, из 1259 оплодотворенных ооцитов удалось получить 127 эмбрионов, а стадии дробления достигли только 60,2% [70]. Полученные авторами данные могут свидетельствовать о снижении оплодотворяющей способности лиофилизированной спермы с течением времени и, как следствие, ограниченным сроком ее хранения. Для определения максимальных сроков хранения лиофилизированных образцов необходимы дополнительные долгосрочные исследования.

В 2012 году Kaneko T. et al. было проведено исследование по оценке влияния длительного хранения лиофилизированных сперматозоидов мышей на их оплодотворяющую способность. Температура образцов во время хранения составила 4 °С. В результате не было получено существенных различий в развитии эмбрионов, полученных из лиофилизированных сперматозоидов мышей линии C57BL/6J, хранившихся в течение 3 лет, по сравнению со свежеполученными или лиофилизированными сперматозоидами, хранившимися в течение короткого срока [71]. Эти же исследователи в том же году использовали лиофилизированное семя крыс спустя 5 лет после высушивания. При этом из 92 оплодотворенных ооцитов они получили 10 эмбрионов [72].

Что же касается кроликов, то на сегодняшний день описано лишь одно подобное исследование. Авторы Liu J.-L. et al. в 2004 году получили один мертворожденный плод. В их исследовании лиофилизированное семя использовалось спустя 12-18 месяцев после высушивания. Из 213 оплодотворенных ооцитов стадии бластоцисты достигло лишь 24% зародышей [73].

Сельскохозяйственные животные. На сегодняшний день исследований, описывающих успешное получение жизнеспособного потомства у сельскохозяйственных животных не так много. Nakai M. et al. в 2007 году была произведена подсадка эмбрионов на стадии бластоцисты, полученных при оплодотворении лиофилизированным семенем хряков, свиней. В результате на 39 день после переноса случился выкидыш двух плодов [42]. Это единственное исследование, описывающее получение потомства при использовании лиофилизированного семени у свиней. В 2004 году исследователи Kwon I.-K. et al. при оплодотворении ооцитов свиней лиофилизированным семенем и их культивировании *in vitro* получили следующие результаты. Из 50 оплодотворенных ооцитов доля дробящихся зародышей составила 50%, стадии бластоцисты достигли 10,7%. Высушенное семя использовали после 1-6 месяцев хранения [74]. В 2017 году опубликованы результаты двух исследований Li X.-X. et al., и Olaciregui M. et al. В них доля эмбрионов свиней, дошедших до стадии бластоцисты, составила 19,6% и 40,3%, соответственно [63, 75]. Подобные результаты, как правило, получаются при оплодотворении ооцитов криоконсервированным семенем.

В 2011 году подобное исследование на лошадях, проведенное Choi Y. H. et al., позволило получить двух жеребят. Лيوфилизированное семя жеребцов использовали через 3,5 месяца после высушивания, а при культивировании и оплодотворении ооцитов *in vitro*, 38 11% достигли стадии бластоцисты [76].

При оплодотворении ооцитов коров лиофилизированной спермой быков и дальнейшем их культивировании *in vitro* Keskinetepe L. et al в 2002 году показали, что процент эмбрионов, достигших стадии бластоцисты составил 29,6%. Из 199 ооцитов 63,6% были на различных стадиях дробления. Лيوфилизированное семя использовали спустя 1-3 месяца после высушивания [77]. В исследовании авторов Martins C. et al., в 2007 году использовали высушенную сперму быков для оплодотворения ооцитов *in vitro* после 3 месяцев хранения. При этом из 180 оплодотворенных ооцитов 19,4% достигли стадии бластоцисты [48].

Исследования по использованию лиофилизированной спермы баранов в репродуктивных технологиях на данный момент, как и у быков, ограничиваются оценкой развития эмбрионов при культивировании *in vitro*. Исследования в этой области начались относительно недавно. В 2017 году Olaciregui M. et al. оценивали оплодотворяющую способность высушенной спермы баранов спустя год хранения. Из 101 ооцита 36,6% эмбрионов были на различных стадиях дробления и только 25,6% достигли стадии бластоцисты [67]. В 2018 году Anzalone D. A. et al. оценивали возможность использования

лиофилизированной спермы как альтернативного варианта сохранения вымирающих пород овец. В их исследовании из 56 оплодотворенных ооцитов лишь 10,2% достигли стадии бластоцисты [66]. В этом же году исследователи Palazzese L. et al. анализировали влияние фрагментации ДНК в эпидидимальных лиофилизированных сперматозоидах барана на нарушения в эмбриональном развитии. Культивирование зигот, оплодотворенных высушенными эпидидимальными сперматозоидами, показало, что из 277 ооцитов 22% раздробилось, и лишь 3,01% эмбрионов достигли стадии бластоцисты. При этом у эякулированного лиофилизированного семени показатели были выше и составляли 9,5% эмбрионов, достигших стадии бластоцисты из 242 оплодотворенных ооцитов [64]. Этими же авторами в 2020 году оценивалось влияние метода криоконсервации на дальнейшие показатели сублимированного семени. Было установлено, что в группе, которая сначала подвергалась витрификации из 75 оплодотворенных ооцитов 2,7% достигли стадии бластоцисты, в то время как в группе с протоколом медленного охлаждения семени доля эмбрионов, достигших стадии бластоцисты, составила 7% [78].

У козлов на сегодняшний день описано лишь одно исследование по оценке оплодотворяющей способности лиофилизированного семени. В 2022 году авторы Thiangthientham P. et al. оценивали влияние лиофилизации на качество и оплодотворяющую способность спермы козла, извлеченной из различных частей придатка яичка. Сперма, извлеченная из каудального придатка яичка, пригодная для замораживания и лиофилизации, показала развитие $4,2\% \pm 3,2$ эмбрионов, достигших стадии бластоцисты [79].

Влияние методов криоконсервации на оплодотворяющую способность лиофилизированного семени. Сперматозоиды отличаются от соматических клеток механизмами протаминирования и репарации ДНК. Плотная компактизация ДНК сперматозоидов обеспечивает ее защиту от широкого спектра повреждающих факторов, которые могут вызвать фрагментацию [80]. Авторами González-Marín C. et al. было показано, что ооциты и эмбрионы на ранних стадиях развития способны восстанавливать повреждение ДНК сперматозоидов, поэтому влияние повреждения сперматозоидов на развивающийся эмбрион зависит как от повреждения хроматина сперматозоидов, так и от способности ооцита восстанавливать некоторые из этих повреждений [81].

Поскольку оценка оплодотворяющей способности лиофилизированного семени чаще всего проводится с помощью метода ИКСИ, то выбор метода криоконсервации в большинстве случаев не является основополагающим. При использовании метода ИКСИ целостность хроматина сперматозоидов играет решающую роль, а он слабо подвержен повреждениям даже после процесса криоконсервации с последующей лиофилизацией. У лабораторных животных используется в основном витрификация сперматозоидов, с данным методом удается получать жизнеспособное потомство и высокий выход эмбрионов на стадии бластоцисты. У сельскохозяйственных животных в основном же используются методы поэтапной заморозки, при которых также авторы получали высокий выход эмбрионов на стадии бластоцисты и в некоторых случаях даже жизнеспособное потомство (таблица 2) [74, 84].

Таблица 2. Применение лиофилизированной спермы в репродуктивных технологиях лабораторных и сельскохозяйственных животных

Вид животного	Определение фертильности спермы	Метод сохранения спермы	Метод криоконсервации спермы	Время хранения спермы	Количество ооцитов	Стадия дробления эмбрионов (%)	Стадия бластоцисты (%)	Исход беременности	Ссылка	Автор, год
Лабораторные животные										
Мышь	ИКСИ	Леоф.	В	1 день	275	77,8	-	52 плода	70	Kamada Y. et al., 2018
	ИКСИ	Леоф.	В	1-3 дней	151	78,1	-	12 плодов	69	Ito, D. et al., 2021
	ИКСИ	Леоф.	В	3 месяца	182	70,3	-	10 плодов	69	Ito, D. et al., 2021
	ИКСИ	Леоф.	В	9 месяцев	1317	59,5	-	73 плода	68	Wakayama S. et al., 2017
	ИКСИ	Леоф.	В	1 год	1259	60,2	-	127 плодов	70	Kamada Y. et al., 2018
Крыса	ИКСИ	Леоф.	В	2 дня	139	-	-	11 плодов (1 мертворожденный)	82	Hirabayashi M. et al., 2005
	ИКСИ	Леоф.	В	2–6 недель	203	68	20	9 плодов	83	Kaneko T. et al., 2007
	ИКСИ	Леоф.	В	5 лет	92	-	-	10 плодов	72	Kaneko T. et al., 2012
Кролик	ИКСИ	Леоф.	В	12–18 месяцев	213	-	24	1 мертворожденный плод	73	Liu J.-L. et al., 2004
Сельскохозяйственные животные										
Курица	ИО	Леоф.	МЗ	24 часа	-	-	-	1 оплодотворенное яйцо из 9 снесенных	50	Stanishevskaya et al., 2022
Лошадь	ИКСИ	Леоф.	В	3,5 месяца	38	84	11	2 жеребенка	74	Choi Y. H. et al., 2011
КРС	ИКСИ	Леоф.	МЗ	12 часов	172	41,5±3,1	14,2 ± 2,5	-	44	Hara H. et al., 2014
	ИКСИ	Леоф.	МЗ	1–3 месяцев	199	63,3	29,6	-	77	Keskintepe L. et al., 2002
	ИКСИ	Леоф.	МЗ	3 месяца	180	57,7	19,4	-	48	Martins C. F. et al., 2007
Свинья	ИКСИ	Леоф.	МЗ	-	236	-	12,6 ± 2,0	-	49	Men N. T. et al., 2013

	ИКСИ	Лиоф.	МЗ	1–6 месяцев	50	50,0±1,2	10,7 ± 1,5	-	75	Kwon I.-K. et al., 2004
	ИКСИ	Лиоф.	МЗ	-	124	-	-	Выкидыш двух плодов на 39 день после переноса эмбрионов	42	Nakai M. et al., 2007
	ИКСИ	Высуш. *	-	-	185	74,1±1,3	19,6 ± 2,4	-	75	Li X.-X. et al., 2017
	ИКСИ	Лиоф.	МЗ	1 год	63	53,9	40,3	-	63	Olaciregui M. et al., 2017
Овца	ИКСИ	Лиоф.	МЗ	-	56	32,7	10,2	-	66	Anzalone D. A. et al., 2018
	ИКСИ	Лиоф.	МЗ	-	242	32,2	9,5	-	64	Palazzese L. et al., 2018
	ИКСИ	Лиоф. ЭС	МЗ	-	277	22	3,01	-	64	Palazzese L. et al., 2018
	ИКСИ	Лиоф.	МЗ	1 месяц	132	35,6	7,6	-	78	Palazzese L. et al., 2020
	ИКСИ	Лиоф.	МЗ	1-3 месяцев	100	42	7	-	78	Palazzese L. et al., 2020
	ИКСИ	Лиоф.	МЗ	1,5 года	101	15,8	2	-	78	Palazzese L. et al., 2020
	ИКСИ	Лиоф.	В	1-3 месяцев	75	25,3	2,7	-	78	Palazzese L. et al., 2020
	ИКСИ	Лиоф.	В	1 год	101	36,6	25,6	-	67	Olaciregui M. et al., 2017
Коза	ИКСИ	Лиоф.	МЗ	-	-	-	4,2 ± 3, 2	-	79	Thiangthientham P. et al., 2022

*Примечание: МЗ – протоколы криоконсервации, предполагающие поэтапное снижение температуры образцов, В – витрификация, ИКСИ – интрацитоплазматическая инъекция сперматозоида, ИО – искусственное осеменение, ЭС – Эпидидимальная сперма, * высушивание за счет испарения влаги.*

Заключение. В настоящее время использование лиофилизации как метода сохранения спермы не позволяет получить высокий выход жизнеспособного потомства в сравнении с более традиционным методом – криоконсервацией, исключением являются грызуны, у которых применение данного метода показывает высокие результаты и позволяет получать потомство *in vitro*, используя сублимированное семя. В период с 1950 по 1970 годы ряду исследователей удалось получить высокие результаты при лиофилизации спермы сельскохозяйственных животных, однако повторить их в дальнейшем другим исследователям пока не удалось. На данный момент исследования носят фрагментарный характер, а разработка стандартизированных методик продолжается до сих пор.

Исследования в этой области должны быть направлены на определение оптимального состава среды для лиофилизации, защищающей сперматозоиды во время процедуры лиофилизации на всех этапах, которые должны привести к возможности адаптировать среду к характеристикам семени и соответствовать требованиям различных сельскохозяйственных видов животных.

Следует также провести исследования по улучшению состава криозащитных разбавителей для спермы, снижающих деструктивное влияние активных форм кислорода, поскольку известно, что повреждение ДНК может быть вызвано окислительным стрессом, возникающим после регидратации. Сделать это можно путем добавления природных или синтетических антиоксидантов в разбавитель для спермы. Подобный подход к составлению сред для криоконсервации спермы будет особенно актуальным для птиц, поскольку низкая концентрация цитоплазматических антиоксидантов и высокая концентрация полиненасыщенных жирных кислот делает сперму птиц более восприимчивой к свободнорадикальному окислению липидов.

При разработке протоколов лиофильной сушки спермы необходимо учитывать видовые особенности строения и биохимического состава сперматозоидов разных видов сельскохозяйственных животных. Технологические особенности лиофильной сушки должны быть также подобраны в соответствии с морфофизиологическими особенностями спермы различных видов сельскохозяйственных животных.

Следует адаптировать технологию ИКСИ для лиофилизированной спермы, чтобы повысить долю жизнеспособных эмбрионов, пригодных к дальнейшей трансплантации. Концентрировать внимание на сохранении целостности кинетического аппарата и жизнеспособности сперматозоидов необходимо у тех видов сельскохозяйственных животных, у которых ввиду физиологических особенностей, применение метода ИКСИ не представляется возможным, в частности у птиц. Совершенствование этапов технологии лиофилизации, несомненно, будет основываться на углублении познания фундаментальных механизмов ангидробиоза, использовании инновационных материалов, наночастиц различных химических элементов и техническом обеспечении аппаратурой нового поколения.

Представленный метод сохранения репродуктивных клеток самцов может стать альтернативой криоконсервации спермы, в случае разработки и апробации методики, позволяющей получать жизнеспособное потомство от лиофилизированной спермы и подтвержденной возможностью длительного хранения образцов. Для производителей, сперму которых невозможно сохранить ввиду низкой общей подвижности заморожено/оттаянного семени, данный метод может являться альтернативой.

Литература.

1. Benedict, F.G. The determination of water in foods and physiological preparations / Benedict F.G., Manning C.R. // American journal of Physiology – Legacy Content. – 1905. – Vol. – 13. – № 3. – P. 309.

2. Juan, S. R.-N. Liofilización de alimentos / Juan Sebastián Ramírez Navas. – Universidad del valle cali – Colombia. – 2007.
3. Смит, О. Влияние низких температур на живые ткани и клетки. В кн.: Применение замораживания высушивания в биологии / Под ред. Р. Харриса. – Москва. – 1956. – 432 с.
4. Охапкина, В.Ю. Методы поддержания микробных культур. Часть 2. Лيوфилизация / Теоретическая и прикладная экология. – 2009. – № 4. – С. 21.
5. Flosdorf, E.W. Studies with H. Pertussis: Maintenance of Cultures in Phase I / Flosdorf E.W., Kimball A. C. // Journal of Bacteriology. – 1939. – Vol. 39. – № 3. – P. 255.
6. Flosdorf, E.W. Procedure and apparatus for preservation in “lyophile” form of serum and other biological substances / Flosdorf E.W., Mudd S. // Journal of immunology. – 1935. – Vol. 29. – № 5. – P. 389.
7. Kupletskaya, M. B. Viability of lyophilized microorganisms after 50-year storage / Kupletskaya M. B., Netrusov A. I. // Microbiology. – 2011. – Vol. 80. – № 6. – P. 850.
8. Bond, C. Freeze-drying of yeast cultures / Bond C. // Methods in molecular biology. – 2007. – Vol. 368. – P. 99.
9. Kawamura, S. Freeze-Drying of Yeasts / Kawamura S., Murakami Y., Miyamoto Y., Kimura K. // Cryopreservation and Freeze-Drying Protocols. – 1995. – P. 31.
10. Bunse, T. The preservation of fungal cultures by lyophilization / Bunse T., Steigleder G. K. // Mycoses. – 2009. – Vol. 34. – № 3-4. – P. 173.
11. Olaciregui, M. Freeze-dried spermatozoa: A future tool? / Olaciregui M., Gil L. // Reproduction in domestic Animals. – 2016. – Vol. 52. – P. 248.
12. Polge, C. Revival of Spermatozoa after Vitriification and Dehydration at Low Temperatures / Polge C., Smith A. U., Parkes A. S. // Nature. – 1949. – Vol. 164. – № 4172. – P. 666.
13. Sherman, J. K. Freezing and freeze-drying of human spermatozoa / Sherman J. K., Jerome K. // Fertility and sterility. – 1954. – Vol. 5. – № 4. – P. 357.
14. Sherman, J. K. Freezing and freeze-drying of bull spermatozoa / Sherman J. K. // American journal of physiology-legacy content. – 1957. – Vol. 190. – № 2. – P. 281.
15. Yushchenko, NP. Proof of the possibility of preserving mammalian spermatozoa in a dried state / Yushchenko NP. // Proc Lenin Acad Agr Sci. – 1957. – Vol. 22. – P. 37.
16. Meryman, H. T. Survival of Spermatozoa Following Drying / Meryman H. T., Kafig E. // Nature. – 1959. – Vol. 184. – № 4684. – P. 470.
17. Saacke, R. G. Freeze-drying of Bovine Spermatozoa / Saacke R. G., Almquist J. O. // Nature. – 1961. – Vol 192. – № 4806. – P. 995.
18. Meryman, H. T. Special article freeze-drying of bovine spermatozoa / Meryman H. T., Kafig E. // Journal of reproduction and fertility. – 1963. – Vol 5. – № 1. – P. 87
19. Larson, E.V. Freeze-drying of spermatozoa / Larson E.V., Graham E.F. // Developments in biological standardization. – 1976. – Vol 36. – P. 343.
20. Wakayama, T. Development of normal mice from oocytes injected with freeze-dried spermatozoa / Wakayama T., Yanagimachi R. // Nature biotechnology. – 1998. – Vol 16. – № 7. – P. 639.
21. Tselutin, K. Comparison of cryoprotectants and methods of cryopreservation of fowl spermatozoa / Tselutin K., Seigneurin F., Blesbois E. // Poultry science. – 1999. – Vol. 78. – № 4. – P. 586.
22. Curry, MR. Cryopreservation of semen from domestic livestock / Curry MR. // Reviews of reproduction. – 2000. – Vol. 5. – № 1. – P. 46.
23. Gliozzi, T. M. DNA fragmentation in chicken spermatozoa during cryopreservation / Gliozzi T. M., Zaniboni L., Cerolini S. // Theriogenology. – 2011. – Vol. 75. – № 9. – P. 1613.
24. Partyka, A. Evaluation of fresh and frozen-thawed fowl semen by flow cytometry / Partyka A., Niżański W., Łukaszewicz E. // Theriogenology. – 2010. – Vol. 74. – № 6. – P. 1019.
25. Morris, J. G. Freezing injury: The special case of the sperm cell / Morris J. G., Acton E., Murray B. J., Fonseca F. // Cryobiology. – 2012. – Vol. 64. – № 2. – P. 71.
26. Pegg, D.E. Principles of cryopreservation / Pegg D.E. // In: Wolkers W.F., Oldenhof H., Cryopreservation and Freeze-Drying Protocols, 3rd edn, Methods in Molecular Biology 1257, 2015. – P. 3–19.
27. Sieme, H. Sperm Membrane Behaviour during cooling and cryopreservation / Sieme H., Oldenhof H., Wolkers W. // Reproduction in domestic animals. – 2015. – Vol 50. – № 3. – P. 20.

28. Fraser, L. Effect of different procedures of ejaculate collection, extenders and packages on DNA integrity of boar spermatozoa following freezing–thawing / Fraser L., Strzeżek J. // *Animal reproduction science*. – 2007. – Vol. 99. – № 3-4. – P. 317.
29. Aitken, R. J. Reactive oxygen species as mediators of sperm capacitation and pathological damage / Aitken R. J. // *Molecular reproduction and development*. – 2017. – Vol. 84. – № 10. – P. 1039.
30. Ford, C. Regulation of sperm function by reactive oxygen species / Ford C. // *Human reproduction update*. – 2004. – Vol. 10. – № 5. – P. 387.
31. Pons-Rejraji, H. Rôles des dérivés actifs de l'oxygène (DAO) sur les spermatozoïdes humains et infertilité masculine / Pons-Rejraji H., Sion B., Saez F., Brugnion F., Janny L., Grizard G. // *Gynécologie obstétrique & Fertilité*. – 2009. – Vol. 37. – №6. – P. 529.
32. Kowalczyk, A. Antioxidant effect of Elamipretide on bull's sperm cells during freezing/thawing process / Kowalczyk A., Czerniawska Piątkowska E. // *Andrology*. – 2021. – Vol. 9. – № 4. – P. 1275.
33. Kläver, R. Routine cryopreservation of spermatozoa is safe — Evidence from the DNA methylation pattern of nine spermatozoa genes / Kläver R., Bleiziffer A., Redmann K., Mallidis C., Kliesch S., Gromoll J. // *Journal of assisted reproduction and genetics*. – 2012. – Vol. 29. – № 9. – P. 943.
34. Aitken, R.J. Biological and clinical significance of DNA damage in the male germ line / Aitken R.J., De Lullis G.N., McLachlan R.I. // *International journal of andrology*. – 2008. – Vol 32. – № 1. – P. 46.
35. Agarwal, A. Role of reactive oxygen species in the pathophysiology of human reproduction / Agarwal A., Saleh R.A., Bedaiwy M.A. // *Fertility and sterility*. – 2003. – Vol 79. – № 4. – P. 829.
36. Thomson, L.K. Cryopreservation-induced human sperm DNA damage is predominantly mediated by oxidative stress rather than apoptosis / Thomson L.K., Fleming S.D., Aitken R.J., De Lullis G.N., Zieschang J.A., Clark A.M. // *Human reproduction*. – 2009. – Vol. 24. – № 9. – P. 2061.
37. Плешанов Н. В. Кривоустойчивость спермы петухов в зависимости от содержания в ней липидов / Плешанов Н. В., Станишевская О. И., Силукова Ю.Л. // *Генетика и разведение животных*. – 2017. – № 3. – С. 34.
38. Surai, P. Polyunsaturated fatty acids, lipid peroxidation and antioxidant protection in avian semen / Surai P., Fujihara N., Speake B., Brillard J., Wishart G., Sparks N. // *Asian-Australasian journal of animal sciences*. 2001. – Vol. 17. – № 7. – P. 1024.
39. Partyka, A. Supplementation of Avian Semen Extenders with Antioxidants to Improve Semen Quality—Is It an Effective Strategy? / Partyka A., Niżański W. // *Antioxidants*. – 2021. – Vol. 10. – № 12.
40. Gil, L. Current status of freeze-drying technology to preserve domestic animals sperm / Gil L., Olaciregui M., Luño V., Malo C., González N., Martínez F. // *Reproduction in domestic animals*. – 2014. – Vol 49. – № 4. – P. 72.
41. Olaciregui, M. Freeze dried stallion spermatozoa: Evaluation of two chelating agents and comparative analysis of three sperm DNA damage assays / Olaciregui M., Luño V., Martí J. I., Aramayona J., Gil L. // *Andrologia*. – 2015. – Vol. 48. – № 9. – P. 988.
42. Nakai, M. Effects of chelating agents during freeze-drying of boar spermatozoa on DNA fragmentation and on developmental ability in vitro and in vivo after intracytoplasmic sperm head injection / Nakai M., Kashiwazaki N., Takizawa A., Maedomari N., Ozawa M., Noguchi J., Kaneko H., Shino M., Kikuchi K. // *Zygote*. – 2007. – Vol 15. – № 1. – P. 15.
43. Kusakabe, H. Maintenance of genetic integrity in frozen and freeze-dried mouse spermatozoa / Kusakabe H., Szczygiel M. A., Whittingham D. G., Yanagimachi R. // *Proceedings of the national academy of sciences*. – 2001. – Vol. 98. – № 24. – P. 13501.
44. Hara, H. Adverse effect of cake collapse on the functional integrity of freeze-dried bull spermatozoa / Hara H., Tagiri M., Hwang I. S., Takahashi M., Hirabayasi M. // *Cryobiology*. – 2014. – Vol. 68. – № 3. – P. 354.
45. Crowe, J. H. Anhydrobiosis / Crowe J. H., Hoekstra F. A., Crowe L. M. // *Annual review of physiology*. – 1992. – Vol. 54. – № 1. – P. 579.
46. Wolfe, J. Freezing, drying, and/or vitrification of membrane– solute–water systems / Wolfe J., Bryant G. // *Cryobiology*. – 1999. – Vol 39. – № 2. – P. 103.

47. Wolkers, W. F., Oldenhof, H. Cryopreservation and Freeze-Drying Protocols. - Methods in Molecular Biology, Springer, New York, 2021 – 742 p.
48. Martins, C. F. Effects of freeze-drying on cytology, ultrastructure, DNA fragmentation, and fertilizing ability of bovine sperm / Martins C. F., Báo S. N., Dode M. N., Correa G. A., Rumpf R. // Theriogenology. 2007. – Vol. 67. – № 8. – P. 1307.
49. Men, N. T. Effect of trehalose on DNA integrity of freeze-dried boar sperm, fertilization, and embryo development after intracytoplasmic sperm injection / Men N. T., Kikuchi K., Nakai M., Fukuda A., Tanihara F., Noguchi J., Kaneko H., Linh V. N., Nguyen B.X., Nagai T., Tajima A. // Theriogenology. – 2013. – Vol 80. – № 9. – P. 1033.
50. Stanishevskaya, O. A successful protocol for achieving anhydrobiosis of Gallus Gallus Domesticus spermatozoa while maintaining their fertility IN VIVO / Stanishevskaya O., Silyukova Y., Pleshanov N., Kurochkin A., Fedorova E., Radaev A. // Cryobiology. – 2022. – Vol. 104. – P. 102.
51. Usui, T. Cytotoxicity and oxidative stress induced by the glyceraldehyde-related maillard reaction products for HL-60 cells / Usui T., Shizuuchi S., Watanabe H., Hayase F. // Bioscience, biotechnology, and biochemistry. – 2004. – Vol 68. – № 2. – P. 333.
52. Edeas, M. Maillard Reaction, mitochondria and oxidative stress: potential role of antioxidants / Edeas M., Attaf D., Mailfert A.-S., Nasu M., Joubet R. // Pathologie Biologie. – 2010. – Vol. 58. – № 3. – P. 220.
53. Drobnis, E. Z. Cold shock damage is due to lipid phase transitions in cell membranes: A demonstration using sperm as a model / Drobnis E. Z., Crowe L. M., Berger T., Anchordoguy T. J., Overstreet J. W., Crowe J. H. // Journal of experimental zoology. – 1993. – Vol 265. – № 4. – P. 432.
54. Van Winden, E. C. Freeze-Drying of Liposomes: Theory and Practice / Van Winden E. C. // Methods in enzymology. – 2003. – Vol. 367. – P. 99-110.
55. Crowe, J. H. Preservation of dry liposomes does not require retention of residual water / Crowe J. H., Spargo B. J., Crowe L. M. // Proceedings of the National Academy of Sciences. – 1987. – Vol. 84. – № 6. – P. 1537.
56. França, M. B. Oxidative stress and its effects during dehydration / França M. B., Panek A. D., Eleutherio E. C. A. // Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology. – 2007. – Vol. 146. – № 4. – P. 621.
57. Карбышев, М.С. Биохимия оксидативного стресса: учеб. метод. пособие / Карбышев М.С., Абдулаев Ш.П. – Москва: ФГБОУ ВО РНИМУ, 2018. – 60 с.
58. Kusakabe, H. Chromosomal integrity and DNA damage in freeze-dried spermatozoa / Kusakabe H. // Reproductive medicine and biology. – 2011. – Vol. 10. – № 4. – P. 199.
59. Kusakabe, H. Maintenance of genetic integrity in frozen and freeze-dried mouse spermatozoa / Kusakabe H., Szczygiel M. A., Whittingham D. G., Yanagimachi R. // Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2001. – Vol. 98. – № 24. – P. 13501.
60. Bakst, M. R. The inner perivitelline layer sperm hole assay: Use of filter paper rings for the isolation of the perivitelline layer overlying the germinal disc and new observations on its morphology / Bakst M. R., Eastridge J., Malecki I. A. // The journal of applied poultry research. 2014. – Vol. 23. – № 1. – P. 121.
61. Restrepo, G. Freezing, vitrification and freeze-drying of equine spermatozoa: impact on mitochondrial membrane potential, lipid peroxidation and DNA integrity / Restrepo G., Varela E., Duque J. E., Gómez J. E., Rojas M. // Journal of Equine Veterinary Science. – 2018. – Vol. 72. – P. 8.
62. Oldenhof, H. Freezing-induced uptake of disaccharides for preservation of chromatin in freeze-dried stallion sperm during accelerated aging / Oldenhof H., Zhang, M., Narten K., Bigalk J., Sydykov B., Wolkers W. F., Sieme H. // Biology of reproduction. – 2017. – Vol. 97. – № 6. – P. 892.
63. Olaciregui, M. Chelating agents in combination with rosmarinic acid for boar sperm freeze-drying / Olaciregui M., Luño V., González N., Domingo P., Blas I., Gil L. // Reproductive Biology. – 2017. – Vol. 17. – № 3. – P. 193.
64. Palazzese, L. DNA fragmentation in epididymal freeze-dried ram spermatozoa impairs embryo development / Palazzese L., Gosálvez J., Anzalone D. A., Loi P., Saragusty J. // Journal of reproduction and development. – 2018. – Vol. 64. – № 5. – P. 393.
65. Arav, A. High post-thaw survival of ram sperm after partial freeze-drying / Arav A., Idda A., Nieddu S. M., Natan Y., Ledda S. // Journal of Assisted Reproduction and Genetics. – 2018. – Vol. 35. – № 7. – P. 1149.

66. Anzalone, D. A. Freeze-dried spermatozoa: An alternative biobanking option for endangered species / Anzalone D. A., Palazzese L., Iuso D., Martino G., Loi P. // *Animal reproduction science*. – 2018. – Vol. 190. – P. 85.
67. Olaciregui, M. In vitro developmental ability of ovine oocytes following intracytoplasmic injection with freeze-dried spermatozoa / Olaciregui M., Luño V., Domingo P., González N., Gil L. // *Scientific Reports*. – 2017. – Vol. 7. – № 1.
68. Wakayama, S. Healthy offspring from freeze-dried mouse spermatozoa held on the International Space Station for 9 months / Wakayama S., Tada M., Osada I., Nagamatsu A., Kamimura S., Nagatomo H., Mizutani E., Ishino F., Yano S., Wakayama, T. // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2017. – Vol. 114. – № 23. – P. 5988.
69. Ito, D. Mailing viable mouse freeze-dried spermatozoa on postcards / Ito D., Wakayama S., Emura R., Ooga M., Wakayama T. // *iScience*. – 2021. – Vol. 24. – № 8.
70. Kamada, Y. Assessing the tolerance to room temperature and viability of freeze-dried mice spermatozoa over long-term storage at room temperature under vacuum / Kamada Y., Wakayama S., Shibasaki I., Ito D., Kamimura S., Ooga M., Wakayama T. // *Scientific Reports*. – 2018. Vol. 8. – № 1.
71. Kaneko, T. Long-term preservation of freeze-dried mouse spermatozoa / Kaneko T., Serikawa T. // *Cryobiology*. – 2012. – Vol. 64. – № 3. – P. 211.
72. Kaneko, T. Successful Long-Term Preservation of Rat Sperm by Freeze-Drying / Kaneko, T., Serikawa, T. // *PLoS ONE*. – 2012. – Vol. 7. – № 4.
73. Liu, J.-L. Freeze-Dried Sperm Fertilization Leads to Full-Term Development in Rabbits / Liu J.-L., Kusakabe H., Chang C.-C., Suzuki H., Schmidt D. W., Julian M., Pfeffer R., Bormann C.L, Tian X.C., Yanagimachi R., Yang X. // *Biology of reproduction*. – 2004. – Vol. 70. – № 6. – P. 1776.
74. Kwon, I.-K. Activation, pronuclear formation, and development in vitro of pig oocytes following intracytoplasmic injection of freeze-dried spermatozoa / Kwon I.-K., Park K.-E., Niwa K. // *Biology of reproduction*. – 2004. – Vol. 71. – №5. – P. 1430.
75. Li, X.-X. Tauroursodeoxycholic acid enhances the development of porcine embryos derived from in vitro-matured oocytes and evaporatively dried spermatozoa / Li X.-X., Diao Y.-F., Wei H.-J., Wang S.-Y., Cao X.-Y., Zhang Y.-F., Tong C., Li D.-L., Kim M.K., Xu, B. // *Scientific Reports*. – 2017. – Vol 7. – № 1.
76. Choi, Y. H. Production of live foals via intracytoplasmic injection of lyophilized sperm and sperm extract in the horse / Choi Y. H., Varner D. D., Love C. C., Hartman D. L., Hinrichs K. // *Reproduction*. – 2011. – Vol. 142. – № 4. – P. 529.
77. Keskinetepe, L. Bovine blastocyst development from oocytes injected with freeze-dried spermatozoa / Keskinetepe L., Pacholczyk G., Machnicka A., Norris K., Curuk M. A., Khan I., Brackett B. G. // *Biology of Reproduction*. – 2002. – Vol. 67. – № 2. – P. 409.
78. Palazzese, L. Whole genome integrity and enhanced developmental potential in ram freeze-dried spermatozoa at mild sub-zero temperature / Palazzese L., Anzalone D. A., Turri F., Faieta M., Donnadio A., Pizzi F., Pittia P., Matsukawa K., Loi P. // *Scientific Reports*. – 2020. – Vol 10. – № 1.
79. Thiangthientham, P. Effects of freeze-drying on the quality and fertilising ability of goat sperm recovered from different parts of the epididymis / Thiangthientham P., Kallayanathum W., Anakkul N., Suwimonteerabutr J., Santiviparat S., Techakumphu M., Loi P., Tharasanit T. // *Theriogenology*. – 2023. – Vol. 195. – № 1. – P. 31.
80. González-Marín, C. Types, causes, detection and repair of DNA fragmentation in animal and human sperm cells / González-Marín C., Gosálvez J., Roy R. // *International journal of molecular sciences*. – 2012. – Vol. 13. – № 12. – P. 14026.
81. Patrick, J., Comizzoli P., Elliott G. Dry preservation of spermatozoa: considerations for different Species / Patrick, J., Comizzoli, P., Elliott, G. // *Biopreservation and biobanking*. – 2017. – Vol. 15. – № 2. – P. 158.
82. Hirabayashi, M. Viable rat offspring derived from oocytes intracytoplasmically injected with freeze-dried sperm heads / Hirabayashi M., Kato M., Ito J., Hochi S. // *Zygote*. – 2005. – Vol. 13. – № 1. – P. 79.
83. Kaneko, T. Offspring derived from oocytes injected with rat sperm, frozen or freeze-dried without cryoprotection / Kaneko T., Kimura S., Nakagata N. // *Theriogenology*. – 2007. – Vol. 68. – № 7. – P. 1017.
84. Rajska, I. Freeze Drying as a Method of Long-Term Conservation of Mammalian Semen – A Review / Rajska I. // *Annals of Animal Science*. – 2021. – Vol. 21. – № 4.

УДК 612.622.089:636.32/.38

Развитие технологии лапароскопического извлечения ооцитов у овец

Луканина В.А., Чинаров Р.Ю.

ФГБНУ ФИЦ ВИЖ им. Л.К. Эрнста

Московская обл., Россия

Аннотация. Получение эмбрионов *in vitro* (IVP-эмбрионы) путем использования ооцитов, полученных с помощью УЗИ-ассистированной пункции фолликулов, является широко применяемой практикой в современной системе генетического совершенствования крупного рогатого скота. За последние 10 лет число IVP-эмбрионов значительно выросло, превысив 1521,0 тыс. штук в 2021 году. Доля IVP-эмбрионов в общем объеме производства увеличилась с 39,5% до 79,7% в 2021 году. Это демонстрирует превосходство IVP перед традиционным методом МОЕТ для крупного рогатого скота. Технология МОЕТ была внедрена в практику овцеводства более двух десятилетий назад. Однако, высокие индивидуальные различия между донорами в реакции на суперовуляцию и вариабельность в эффективности методов получения и трансплантации эмбрионов (от 22% до 80%) стали ограничивающими факторами для широкого применения данной технологии.

В 1990-х годах были оптимизированы этапы технологии получения IVP-эмбрионов у овец, которые до сих пор успешно применяются с незначительными изменениями. Результативность этого процесса оценивается примерно на одном уровне в большинстве исследований: созревание эмбрионов от профазы I до метафазы II составляет 70-90%, оплодотворение и первое деление – дробление – от 50 до 80%, выход бластоцист – от 20 до 50%. Однако основным ограничением для широкого практического применения этой технологии является использование яйцеклеток из яичников, извлекаемых после смерти животного.

Лапароскопический метод извлечения яйцеклеток у овец считается одним из наиболее малоинвазивных в биотехнологии репродукции животных. Этот метод позволяет проводить операцию у живого донора быстро, эффективно и без осложнений, минимизируя травматичность процедуры. Благодаря лапароскопии можно извлекать яйцеклетки высокого качества, годные для последующего созревания и оплодотворения *in vitro*. Однако есть недостатки в использовании этого метода у овец, такие как непостоянная эффективность, недостаточная повторяемость результатов и различные варианты методики с разной эффективностью.

В обзоре мы проанализировали статистические показатели и технологические особенности методики с целью выявления основных направлений ее улучшения и выбора оптимальной стратегии для развития данной технологии в России.

Ключевые слова: прижизненное получение ооцитов, LOPU, овцы, эмбрионы, лапароскопия, IVP.

Для цитирования: Луканина В.А., Чинаров Р.Ю. Развитие технологии лапароскопического извлечения ооцитов у овец // Успехи наук о животных. 2025. № 1. С. 53–75. doi: 10.25687/3034-493X.2025.2.1.004

Development of laparoscopic oocyte technology in sheep

V.A. Lukanina, R. Yu. Chinarov

L.K. Ernst Federal Research Center for Animal Husbandry
Moscow Region, Russia

Abstract. Obtaining *in vitro* embryos (IVP-embryos) by using oocytes obtained by ultrasound-assisted follicle puncture is a widely used practice in the current bovine genetic improvement system. The number of IVP-embryos has increased significantly over the past 10 years, exceeding 1521.0 thousand in 2021. The share of IVP embryos in total production has increased from 39.5% to 79.7% in 2021. This demonstrates the superiority of IVP over the traditional MOET method for cattle. MOET technology was introduced into sheep production practices more than two decades ago. However, high individual differences between donors in superovulation response and variability in the efficiency of embryo retrieval and transplantation methods (22% to 80%) have been limiting factors for widespread use of this technology. In the 1990s, techniques for obtaining IVP embryos from ewes were optimized and are still being used successfully with minor modifications. The efficiency of this process is estimated at approximately the same level in most studies: embryo maturation from prophase I to metaphase II is 70-90%, fertilization and first division - fragmentation - from 50 to 80%, blastocyst yield - from 20 to 50%. However, the main limitation for the wide practical application of this technology is the use of oocytes from ovaries extracted after the death of the animal. Laparoscopic oocyte retrieval in sheep is considered to be one of the most minimally invasive methods in animal reproductive biotechnology. This method allows the operation to be performed on a live donor quickly and efficiently, minimizing the trauma of the procedure and preserving the excellent condition of the animals. Thanks to laparoscopy, it is possible to extract high quality eggs suitable for subsequent maturation and fertilization *in vitro*. However, there are disadvantages to using this method in sheep, such as inconsistent efficacy, lack of repeatability of results and different variants of the technique with varying efficacy. In this review, we analyzed the statistical and technological features of the technique in order to identify the main directions of its improvement and to choose the optimal strategy for the development of this technology in Russia.

Key words: vital oocyte retrieval, LOPU, ewes, embryos, laparoscopy, IVP.

For citation: Lukanina VA, Chinarov RYu. Development of laparoscopic oocyte technology in sheep. Ernst Journal of Animal Science. 2025. 1: 53–75. Russian. doi: 10.25687/3034-493X.2025.2.1.004

In vitro (IVP) получение эмбрионов, в котором используются ооциты, извлечённые с помощью прижизненной УЗИ-ассистированной пункции фолликулов, стало широко распространённым методом генетического улучшения как молочного, так и мясного крупного рогатого скота [1]. Процесс производства IVP-эмбрионов включает три этапа: созревание (IVM, *in vitro maturation*), оплодотворение (IVF, *in vitro fertilization*) и культивирование (IVC, *in vitro culture*). О преимуществах вышеуказанной технологии перед традиционной технологией трансплантации эмбрионов после полиовуляции (МОЕТ) у крупного рогатого скота свидетельствует наблюдаемый в последнее десятилетие поступательный рост числа IVP-эмбрионов с 457,5 тыс. штук в 2013 году до 1521,0 тыс. штук в 2021 году, в результате чего доля IVP-эмбрионов в общем объеме коммерческого производства эмбрионов коров увеличилась с 39,5 до 79,7% [2]. Перспективы МОЕТ у овец обсуждались еще в середине 80-ых годов прошлого века, однако интеграция данной технологии в практическое овцеводство в то время требовала изменения структуры племенной работы и селекции специализированного племенного ядра [3]. В практику овцеводства технология МОЕТ была внедрена чуть более двух десятилетий назад [4]. Однако, высокие индивидуальные различия между отдельными донорами в отношении реакции на суперовуляцию [5], а также высокая вариабельность в эффективности методов получения и трансплантации эмбрионов (22-80%) [6; 7; 8] стали лимитирующими факторами широкого распространения данной технологии. О первом успешном применении экстракорпорального оплодотворения ооцитов, созревших *in vitro*, у овец было сообщено учеными Кембриджского университета (Великобритания) в 1986 году [9]. В начале 1990-х годов технология выполнения всех трех этапов получения IVP-эмбрионов овец были оптимизированы и с незначительными модификациями используются в настоящее время. Результативность получения IVP-эмбрионов у овец в большинстве работ находится приблизительно на одном и том же уровне: доля созревших от профазы I до метафазы II – 70–90%; оплодотворившихся ооцитов и первого деления – дробления – от 50–80%; выход бластоцист – 20–50% (табл. 1) [10].

Как следует из данных, представленных в таблице 1, в подавляющем большинстве исследований источником яйцеклеток для получения IVP-эмбрионов у овец являются яичники, извлекаемые *post mortem*, что на наш взгляд, является основным ограничением широкого практического использования технологии получения IVP-эмбрионов.

Целью настоящего обзора является анализ научно-методической литературы по проблеме прижизненного получения ооцитов у овец как источника для получения IVP-эмбрионов для определения основных направлений ее совершенствования и выбора оптимальной стратегии для развития данной технологии в России.

Как уже отмечалось выше, для получения IVP-эмбрионов у овец, главным образом, используются ооциты, получаемые из яичников *post mortem* [37], что существенно ограничивает использование технологии в селекционных целях. Это обуславливает научный и практический интерес развития технологий прижизненного получения ооцитов у овец. Изначально для получения ооцитов от живых доноров путем аспирации фолликулов яичников использовали хирургический метод, однако выполнение такой процедуры сопряжено с повышенной травматичностью, что ограничивает возможность многократного использования одних и тех же животных [38]. В этой связи, получает развитие использование малоинвазивных эндоскопических методов [38].

Таблица 1. Статистика получения IVP-эмбрионов у овец* [по [10] с дополнениями].

Год	Страна	Тип семени	Источник ОКК	Доля оплодотворения, %	Выход бластоцист, %	Ссылка
2012	IR	З	<i>p.m.</i>	70	≈ 80%	[11]
2012	UK	З	<i>p.m.</i>	76,6	59,2	[12]
2016	IT	З	<i>p.m.</i>	74,5	59,2	[13]
2016	BR	З	<i>p.m.</i>	71,6	48,9	[14]
2012	IR	З	<i>p.m.</i>	71,7	48,1	[15]
2013	UK	З	<i>p.m.</i>	74	45,1	[16]
2012	PO	С З	<i>p.m.</i>	45,1 ± 3,5	42,8	[17]
2014	IR	З	<i>p.m.</i>	89,8	42,4	[18]
2013	IT	С	<i>p.m.</i>	80	42	[19]
2014	UR	З	<i>p.m.</i>	79	41,3	[20]
2015	CN	С	<i>p.m.</i>	72,3	41,1	[21]
2012	IR	С	<i>p.m.</i>	50	40	[22]
2015	IR	С	<i>p.m.</i>	71,4	37,8	[23]
2013	CN	З	<i>p.m.</i>	76,5	36,7	[24]
2016	IT	С	<i>p.m.</i>	77,8	35,8	[25]
2016	IR	З	<i>p.m.</i>	85	35,4	[26]
2012	SP	С	<i>p.m.</i>	79,2 ± 2,4	32,1	[27]
2014	SP	З	<i>p.m.</i>	75,9	31,7	[28]
2012	SP	З	<i>p.m.</i>	–	24,1	[27]
2015	IR	З	<i>p.m.</i>	63	20	[29]
2014	SP	З	<i>p.m.</i>	77,7	15,7	[30]
2012	SP	С	<i>p.m.</i>	68,3	13,3	[31]
2013	SP	З	<i>p.m.</i>	52	–	[32]
1996	AG	С	LOPU	–	13,1 – 20,8	[33]
1996	AG	С	LOPU	–	19,2 – 23,3	[33]
2013	SP	С	LOPU	87,8	37,7	[34]
2007	CHI	З	LOPU	76	61,5	[35]
2024	CN	З	LOPU			[36]

Примечание: *данные отсортированы по проценту выхода бластоцист (по убыванию) отдельно для ооцитов, полученных *post mortem* (*p.m.*) и посредством LOPU (*laparoscopic ovum pick up* – лапароскопическая пункция фолликулов); страна: AG – Аргентина; BR – Бразилия; CN – Китай; IR – Иран; IT – Италия; PO – Португалия; SP – Испания; UK – Великобритания; UR – Уругвай; AU – Австралия; CHI – Чили; тип семени: С – свежеполученное, З – заморожено-оттаянное

У сельскохозяйственных животных эндоскопические методы находят применение для внутриматочного осеменения, извлечения яйцеклеток, трансплантации эмбрионов, а также в диагностических целях, например, для оценки состояния яичников и матки, наблюдения за овуляцией и развитием желтого тела [39; 40; 6]. У мелкого рогатого скота наблюдается растущий интерес к нехирургическим методам извлечения и трансплантации эмбрионов, а также извлечения яйцеклеток для исследовательских целей и практического

применения [7]. Это объясняется стремлением максимально использовать генетический потенциал животных на основе современных биотехнологических методов, таких как синхронизация охоты, суперовуляция, извлечение яйцеклеток, созревание и оплодотворение *in vitro*, криоконсервация и трансплантация эмбрионов [41; 42; 43].

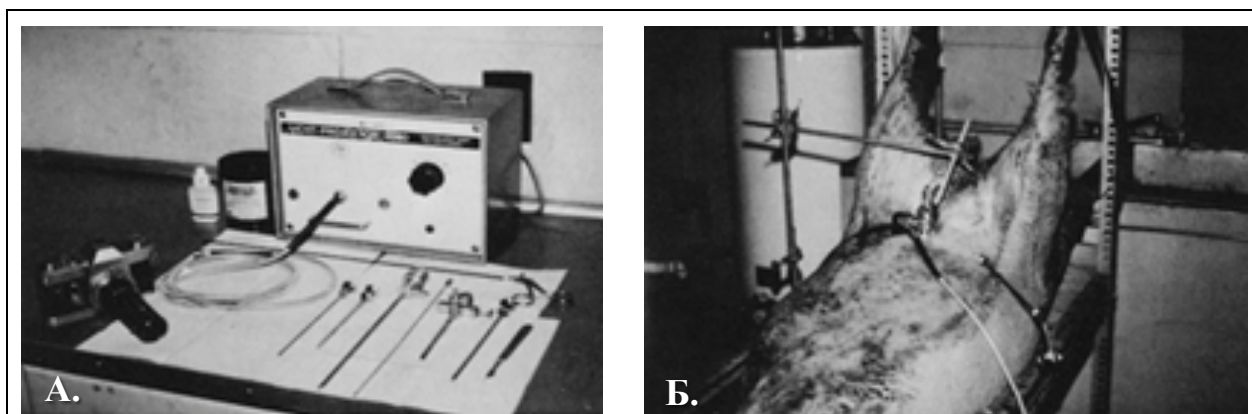


Рисунок 1. Лапароскопическое оборудование (А) и расположение инструментов (Б), использованное Snyder D.A. и Dukelow W.R. [50]

У овец для прижизненного извлечения яйцеклеток возможно использовать технологию лапароскопической пункции фолликулов (*Laparoscopic Ovum Pick-Up, L-OPU*), которая обеспечивает практически бескровный и быстрый доступ к органам брюшной полости, простые способы фиксации яичников и аспирацию фолликулов [44; 45; 46]. Первые попытки применения лапароскопического метода для обследования яичников у овец начались в 60-70-ых годах прошлого века. В 1968 году Roberts E.M. [47] впервые описал лапароскопию у овец, используя срединно-брюшной доступ и удаленный источник света. В 1973 году Boyd J.S. и Ducker M.J.A. [48] использовали секционный стол, который для выполнения срединно-вентральной лапароскопии у овец позволял поднять брюшную полость, сохраняя горизонтальное положение грудной полости. В вышеназванных работах участки разрезов были выбраны на 4 см латеральнее средней линии и несколько сантиметров краниальнее от молочных желез. Seeger K. [49] для проведения лапароскопии у овец выполнял разрез на 1,5 см краниальнее молочных желез и на 2 см латеральнее средней линии. Детальное описание проведения лапароскопической процедуры с целью обследования яичников было представлено в работе Snyder D.A. и Dukelow W.R. [50]. Лапароскопическое исследование проводилось с помощью педиатрического лапароскопа диаметром 5 мм и длиной 24,5 см с углом обзора 135°. Свет передавался по волоконно-оптическому кабелю от источника света проектора модели 4000 (Richard Wolf, GmbH, Книтлинген, ФРГ) (рис. 1А). Овцематок помещали в положение лежа на спине с головой вниз на столе с наклоном 45°, который был модифицирован по сравнению с описанным в работе Wildt D. E. с соавт. [51]. Для проведения исследований выполняли разрез кожи длиной 1 см, расположенный по средней линии на 1-2 см краниальнее молочной железы. Для входа в брюшную полость через мышечный слой использовали конический троакар. Лапароскоп вводили в брюшную полость через 6-миллиметровую канюлю, снабженную насадкой для уменьшения давления в брюшной полости. Для облегчения обследования использовали лапароскопические щипцы, точка ввода которых располагалась на 5-6 см латеральнее. Расположение лапароскопических инструментов показано на рисунке 1Б. После проведения процедуры разрезы обычно не требовали шитья, на них наносилось обильное количество асептической мази (Фурацин, Eaton Laboratories, Новая Зеландия). При сильном кровотечении выполняли один кожный шов. Обследование обоих яичников и матки с

помощью лапароскопии обычно занимало около 10 минут после введения инструмента. Весь процесс, начиная от анестезии и заканчивая восстановлением животного, обычно занимал от 20 до 30 минут.

Следующим этапом стала разработка методики извлечения яйцеклеток посредством аспирации фолликулов яичников *in vivo* под лапароскопическим контролем. Несмотря на то, что о первом успешном применении L-OPU для получения ооцитов у овец было сообщено более 50 лет назад [50], технология все еще не нашла широкого применения, так как характеризуется недостаточной воспроизводимостью результатов и различной эффективностью [39; 52; 35]. На эффективность технологии оказывают влияние ряд факторов, включая породу и индивидуальные особенности животных, схемы синхронизации и суперовуляции, методики проведения предоперационных и хирургических процедур. Исходя из вышеизложенного, актуальным является проведение исследований, направленных на дальнейшее совершенствование технологии L-OPU в отношении повышения ее эффективности.

Анализ научно-информационных источников по изучаемой проблеме показывает, что эффективность технологии может быть повышена в результате оптимизации технических и технологических параметров проведения процедуры. **Технические параметры**, оказывающие влияние на результативность L-OPU, включают положение животного на операционном столе во время проведения процедуры (лежа на боку или на спине), типы инструментов и точки для абдоминального доступа, обеспечивающие визуализацию и позиционирование яичников, тип анестезии, метод аспирации фолликулов (отсасывание фолликулярной жидкости с помощью шприца или используя давление вакуума), давление вакуума и калибр пункционной иглы. К **технологическим параметрам**, способным оказать влияние на результативность L-OPU, относятся используемые схемы синхронизации и суперстимуляции, временные режимы проведения L-OPU (интервал между сеансами, продолжительность серии последовательных сеансов L-OPU, период отдыха между сериями).

Для проведения L-OPU животных, как правило, кладут на операционный стол **лежа на спине головой вниз под углом 40-45°** [53; 54; 50; 35], реже используют угол наклона **30°** [46]. Рядом авторов была изучена возможность проведения L-OPU с использованием бокового доступа [46; 55; 56], вызвавшая дискуссию между сторонниками и противниками данной методики. Так, Mariano R.S.G. с соавт. [56] показали, что позиционирование животных на правом боку с наклоном головы вниз под углом 10° обеспечивает отличный доступ к репродуктивным органам, позволяя проводить манипуляции и обеспечивая хорошую визуализацию яичников. При этом количество аспирированных фолликулов и извлеченных ооцитов не различалось при использовании бокового доступа и при традиционном положении животного на спине с наклоном головы вниз под углом 35°, что согласуется с данными, представленными Stangl M. с соавт. [46]. Rasmussen J.P. с соавт. [57] и Mullett C.E. с соавт. [58]. Вместе с тем учёные полагают, что лапароскопические процедуры, проводимые в положении лежа на боку, могут приводить к повышенному поглощению CO₂. Это объясняется наличием большего количества мягких тканей, которые подвергаются воздействию газа. В результате происходит расширение сосудов и стимуляция симпатической системы, что может вызвать тахикардию и гипертонию. Другие исследования также указывают на то, что увеличение объема брюшной полости может вызывать высвобождение вазоактивных факторов, что, в свою очередь, приводит к повышению артериального давления и частоты сердечных сокращений [59]. Hayden P. с соавт. [60] и Lemos S.L.S. с соавт. [61] показали, что после проведения процедуры при боковом положении и при положении на спине животные испытывали ацидоз, гиперкапнию, гипоксию и резкое увеличение уровня бикарбоната. Индуцированный пневмоперитонеум

приводит к ограничению движения диафрагмы, повышению внутригрудного давления (ИТР), снижению остаточной функциональной емкости легких, а также увеличению поглощения CO_2 . Это может вызвать ателектаз, нарушение соотношения вентиляции и перфузии, а также гипоксию и гиперкапнию [61; 62]. Исследования, проведенные Duke T. et al. [63], Hazebroek E.J. et al. [64] и Fujise K. et al. [65] показывают, что при выполнении лапароскопических операций с использованием L-OPU с боковым доступом рекомендуется наклон головы вниз и создание пневмоперитонеума с углекислым газом. Это помогает снизить давление на диафрагму и магистральные сосуды, что, в свою очередь, может уменьшить кардиореспираторные изменения. Хотя существует ограниченное количество исследований, оценивающих эффект положения на боку при проведении лапароскопических процедур, полученные результаты подчеркивают важность правильной позиции для оптимизации результатов операции.

Используемые инструменты и технические характеристики устройств, применяемые для извлечения ооцитов посредством аспирации фолликулов, обобщены в таблице 2.

Таблица 2. Используемые инструменты, точки абдоминального доступа и положение животного при проведении L-OPU

Эндоскоп	Точка доступа троакара		Положение животного	Ссылка
	для эндоскопа	для щипцов		
Телескоп Хопкинса 30°, (Karl Storz, Вена, Австрия)	по средней вентральной линии на ≈ 10 см каудальнее пупка	на ≈ 15 см каудальнее пупка и на 5 см латеральнее от средней линии	в люльке в положении лежа на спине вниз головой под углом 30°.	[46]
Жесткий эндоскоп	по средней линии, на 20 см краниальнее вымени	на 10-15 см краниальнее вымени и на 5 см медиальнее средней линии; на 10-15 см краниальнее вымени и на 5 см латеральнее средней линии;	в положении лежа на спине вниз головой под углом 45°.	[54]
Эндоскоп	15 см краниальнее вымени	на 5 см краниальнее вымени и на 10-15 см медиальнее средней линии; на 5 см краниальнее вымени и на 10-15 см латеральнее средней линии;	в положении лежа на спине	[66]
Педиатрический эндоскоп Richard Wolf, GMBH	На средней линии, на 1-2 см краниальнее молочной железы	на 5-6 см латеральнее средней линии и на 1-2 см краниальнее молочной железы	в положении лежа на спине вниз головой под углом 45°.	[50]
Эндоскоп	примерно на 10 см краниальнее вымени	на 10 см краниальнее вымени, на 5 см латеральнее срединной линии		[34]

Эндоскоп	6-10 см от вымени и на 3 см латеральнее от средней линии	6-10 см от вымени и на 3 см медиальнее от средней линии, другой располагался на расстоянии 3-4 мм по средней линии от эндоскопа	в положении лежа на спине вниз головой под углом 40°.	[35]
Эндоскоп	по средней линии, на 20 см краниальнее вымени.	на 10-15 см краниальнее вымени и на 5 см медиальнее средней линии, на 10-15 см краниальнее вымени и на 5 см латеральнее средней линии	в положении лежа на спине вниз головой под углом 45°.	[67]
Эндоскоп	с левой стороны от средней линии, краниальнее вымени на 15 см	с правой стороны от средней линии и примерно в 15 см краниальнее вымени, по средней линии живота, примерно в 30-35 см краниальнее вымени.	в положении лежа на спине вниз головой под углом 45°.	[41]

Процедуры L-OPU, как правило, проводят под общей анестезией, используя Ксилазин (Xylasol, 1 мл/50 кг живого веса; Dr. E. Gtiub AG, Берн, Швейцария) [46], смесь кетамина (5 мг/кг) (Dopalen, Sespo, Паулиния, Бразилия) [68] и гидрохлорида ксилазина (0,2мг/кг-1) [53], смесь кетамина в дозе 5 мг/кг (Dopalen® Sespo, Паулиния, Бразилия) и мидазоламом в дозе 0,2 мг/кг (Dormire®, Кристалия, Итапира, Бразилия) [56], смесь 2 мг кетамина, 0,1 мг диазепама (IM, Diazepam® Cristalia, Бразилия) и 0,05 мг ксилазина и поддерживаем анестезию 2% изофлураном [69], или памлин в дозе 0,2 мг/кг (диазепам; Parnell Laboratories Pty. Ltd., Александрия, Австралия), 4 мг/кг Кетамин (100 мг/мл кетамила в виде гидрохлорида внутримышечно; Parnell Laboratories) и 0,01 мг/кг темгезина (0,3 мг/мл бупренорфина; Reckitt Benckiser, Австралия). Другим популярным наркозным препаратом является пропофол, который применяют в дозах 3 мг/кг (Propofol Lipuro 1%; Braun, Барселона, Испания) [34], 4 мг/кг пропофола (Rapinovet®, Shering-Plough, Хэрфилд, Великобритания) [70] или 6 мг/кг [54]. При использовании пропофола анестезия поддерживалась с помощью изофлурана 2% (Forane®, Zeneca, Эдинбург, Великобритания), испаренного в 100% растворе кислорода, в полужакрытой системе, после эндотрахеальной интубации с помощью 6-миллиметровых трубок с манжетами. Существует протокол использования пропофола без применения изофлюрана: пропофол (Propofol® Cristalia, Бразилия) вводили внутривенно в дозе 6 мг/кг и поддерживали анестезию непрерывной внутривенной инфузией пропофола со скоростью 0,5 мг/кг/мин [67]. Для анестезии также применяют тиопентал натрия в дозе 5-10 мг/кг (Тиопентал 1,0 г, Sandoz GmbH, Кундль, Австрия) [66], промазин гидрохлорид (Sparin®, Wyeth) в дозе 250-350 мг i.m. с последующим (через 5-10 минут) введением пентабарбитала натрия внутривенно в дозе 9-10 мг/кг массы тела [50]. Некоторые исследователи применяют для анестезии авторские смеси, например, SuMianXin II в дозе 0,12 мг/кг живой массы (Институт военной ветеринарии, город Чанчунь, Китай) [36].

Позиционирование инструментов для проведения L-OPU, используемое в работах различных авторов, схематично представлено на рисунке 2.

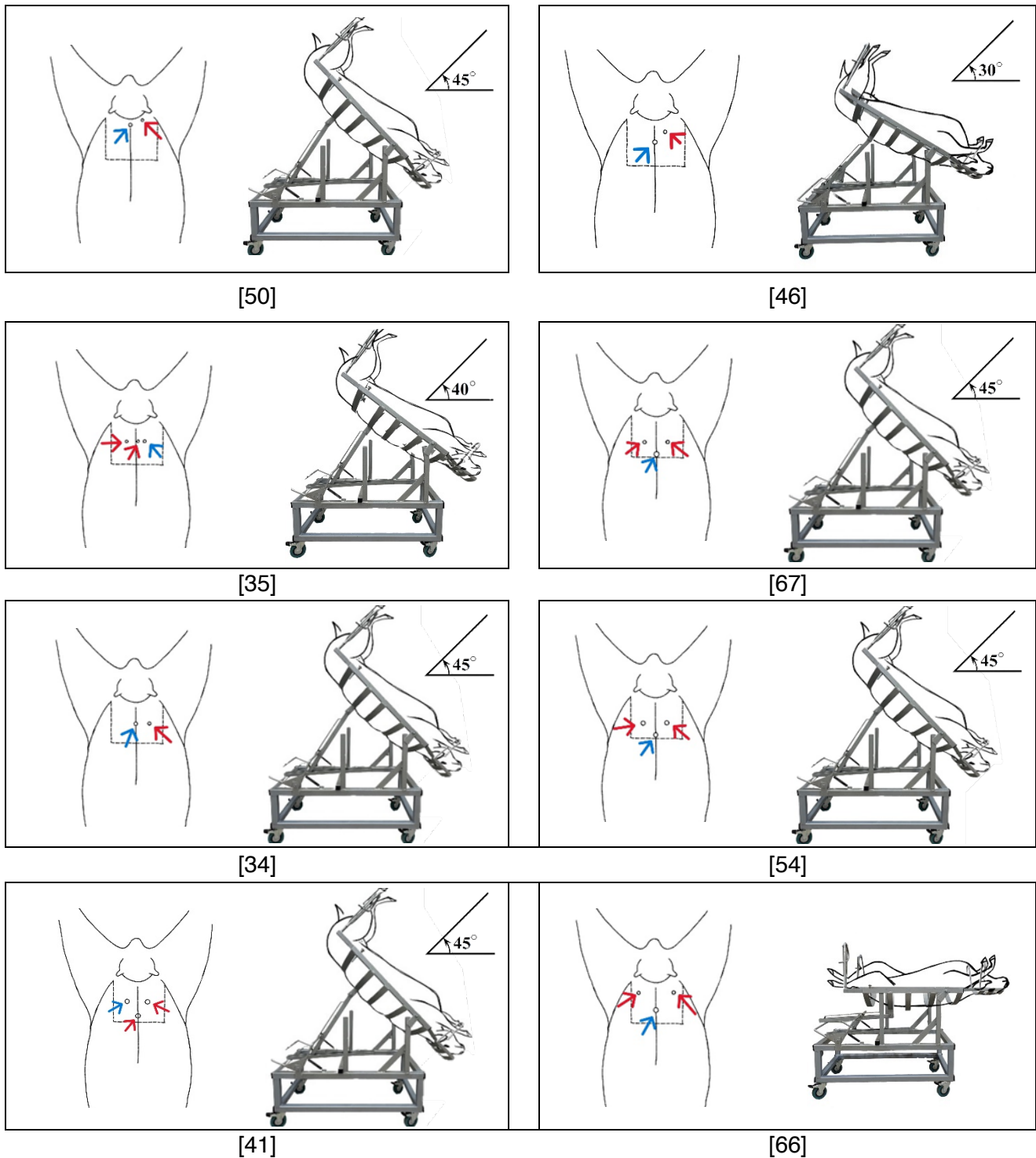


Рис. 2. Схематическое изображение позиционирования животного и инструментов при проведении извлечения ооцитов у овец посредством L-OPU

Примечание: стрелками обозначены места постановки эндоскопа (синяя) и щипцов (красная)

Аспирацию фолликулов проводят посредством прокалывания стенки фолликула с помощью иглы различного диаметра с последующим отсасыванием фолликулярной жидкости с помощью шприца или используя давление вакуума [37]. Фиксацию яичника при проведении процедуры, как правило, осуществляют с помощью щипцов (табл. 3).

Таблица 3. **Используемые варианты фиксации яичников, калибры игл, метод аспирации и давление вакуума при L-OPU**

Фиксация яичника	Калибр иглы	Метод аспирации	Давление вакуума, мм. рт. ст.	Ссылка
Щипцы	23G	1 мл шприц	–	[50]
Щипцы	18G	Вакуумный насос	50 мм рт ст	[33]
Щипцы	20G	5 мл шприц	–	[46]
Мануально	21G	2,5 мл шприц	–	[71]
Щипцы	18G	Вакуумная система (игла, подсоединенная к силиконовой трубке длиной 800 мм (Deltalab®, Испания), которая присоединялась к собирающей трубке. Другая силиконовая трубка (1300 мм; Deltalab®) соединяла собирающую трубку с аспирационным насосом (Minitüb® 23360/9931, Германия)	10 мл/мин	[70]
Щипцы	20G	Вакуумный насос (V-Mars, Cook Ltd, Австралия)	70 мм рт ст	[35]
Щипцы	16G	Аспирационная система, состоящая из иглы, соединенной с шлангом длиной 50 см, соединенной с силиконовой пробкой (Handle Cook®, Бразилия), которая подсоединялась к пробирке для сбора (50 мл). Вакуум создавался аспирационным насосом (Nevoni, Бразилия), подсоединенным к силиконовому шлангу, также подсоединенному к трубке для сбора яйцеклеток.	50 мм. рт. ст.	[67]
Щипцы	22G	Система для аспирации с вакуумным насосом (WTA, Бразилия).		[72]
Щипцы	23G	Вакуумный насос (V-MAR 5100; Cook Ltd, Австралия)	25 мм рт ст	[34]
Щипцы	18G	Однополюсный аспирационный шланг, короткая коническая игла, соединенная с канюлей длиной 50 см, присоединенной к пробирке для сбора крови (50 мл) через силиконовую пробку	50 мм рт.ст. (вакуумный насос, 500 вт)	[54]
Щипцы	22G	Система для аспирации с вакуумным насосом (WTA, Бразилия).	40 мм рт.ст., (цифровой вакуумный насос BV 003d (WTA)	[53]
Щипцы		Катетер со шприцом 10 мл		[66]
Щипцы	20G	Система для аспирации с вакуумным насосом (WTA, Бразилия)	60 мм. рт. ст.	[69]
Щипцы	20G	Вакуумный насос	35-45 мм рт ст	[36]

Примечание: используемое оборудование для аспирации представлено в хронологическом порядке по году выхода первоисточника

Rodríguez С. с соавт. [70] показали, что длина иглы не оказывала влияния на извлечение ооцитов, однако были выявлены достоверные ($p < 0,05$) различия в доле ооцитов хорошего качества (категории I и II): 69,5 против 47,7% при использовании обычной (калибр 18G, длина 82 мм) и длинной иглы (калибр 18G, длина 600 мм) при аспирации фолликулов *post mortem* и 58,1 против 25,4% – при аспирации фолликулов *in vivo*. На основании результатов исследований был сделан вывод, что использование коротких игл калибра 18G является более предпочтительным для проведения OPU у овец.

Как следует из данных, представленных в таблице 3, на начальных этапах развития технологии для отсасывания фолликулярной жидкости использовали шприц [50; 46; 71]. В последующих работах для аспирации фолликулов используют вакуумные системы. Следует отметить, что доля извлеченных ооцитов сильно варьирует между экспериментами вне зависимости от метода аспирации. Так, Snyder D.A. и Dukelow R.W. [50] для проведения процедуры использовали шприц объемом 1 мл с небольшим количеством физиологического раствора, иглу калибра 23G длиной 11 см, которую вводили в брюшную полость через канюлю диаметром 18 мм. Яичники фиксировались неподвижно с помощью лапароскопических щипцов. В результате аспирации 21 фолликула удалось извлечь 6 яйцеклеток, что соответствует извлечению на уровне 28% [50]. В другом исследовании [46] аспирацию фолликулов проводили с помощью шприца объемом 5 мл и иглы калибра 20G, предназначенной для спинномозговой анестезии (SPINOCANB, B. Braun, Германия). Каждый шприц был наполнен примерно 0,5 мл фосфатно-солевого буфера с добавлением 10% FCS. Захват яичников осуществляли атравматичными щипцами. Аспирации подвергали фолликулы диаметром от 2 до 8 мм, при этом каждым шприцом можно было аспирировать от 3 до 6 фолликулов. Сразу после процедуры яичники промывали 50 мл 0,9% раствора NaCl. Средняя степень извлечения ооцитов в эксперименте составила 55,5%. Baldisseri H. с соавт. [33] для проведения аспирации фолликулов под лапароскопическим наблюдением использовали технику вытягивания фимбрий яичников в разные стороны с помощью атравматичных щипцов. Фолликулярную жидкость отсасывали при помощи иглы калибра 18G, вставленной в пластиковую пипетку, подключенную к трубке для сбора и вакуумной линии. После аспирации каждых 3-4 фолликулов пипетку и трубку промывали средой для сбора, содержащей 10 мл TCM 199 с добавлением 0,05 мг/мл гепарина, 100 мг/мл пенициллина, 0,1 мг/мл стрептомицина, 0,05 мг/мл канамицина и 0,5% фракции V бычьего сывороточного альбумина. Давление вакуума поддерживалось на уровне 50 мм рт. ст. на протяжении всего эксперимента. Степень извлечения ооцитов составила 77,3-79,5%.

Таким образом, для проведения L-OPU у овец необходимо использование специального оборудования, включая лапароскоп диаметром 5 или 7 мм с углом наклона 0° или 30° и длиной около 30 см, подключенного к кабелю и источнику света. Для проведения процедуры, как правило, используется насос для инсуффляции, три троакара, в том числе два троакара диаметром 5 мм, один из которых снабжен клапаном для инсуффляции, и один троакара диаметром 3,5 мм, и атравматичные эндоскопические щипцы (рис. 3). Для аспирации в большинстве случаев используют вакуумный насос, который подключается к пробирке OPU, затем к пробирке объемом 50 мл и далее к пипетке для L-OPU. Рекомендуется контролировать давление вакуума, измеряя его в каплях в минуту (скорость прохождения аспирационной среды через аспирационную пипетку и сбор в коллекторную трубку), и поддерживать его на уровне 50-70 капель в минуту [66]. Как до, так и после проведения процедуры рекомендуется промывать систему аспирационной средой [73].

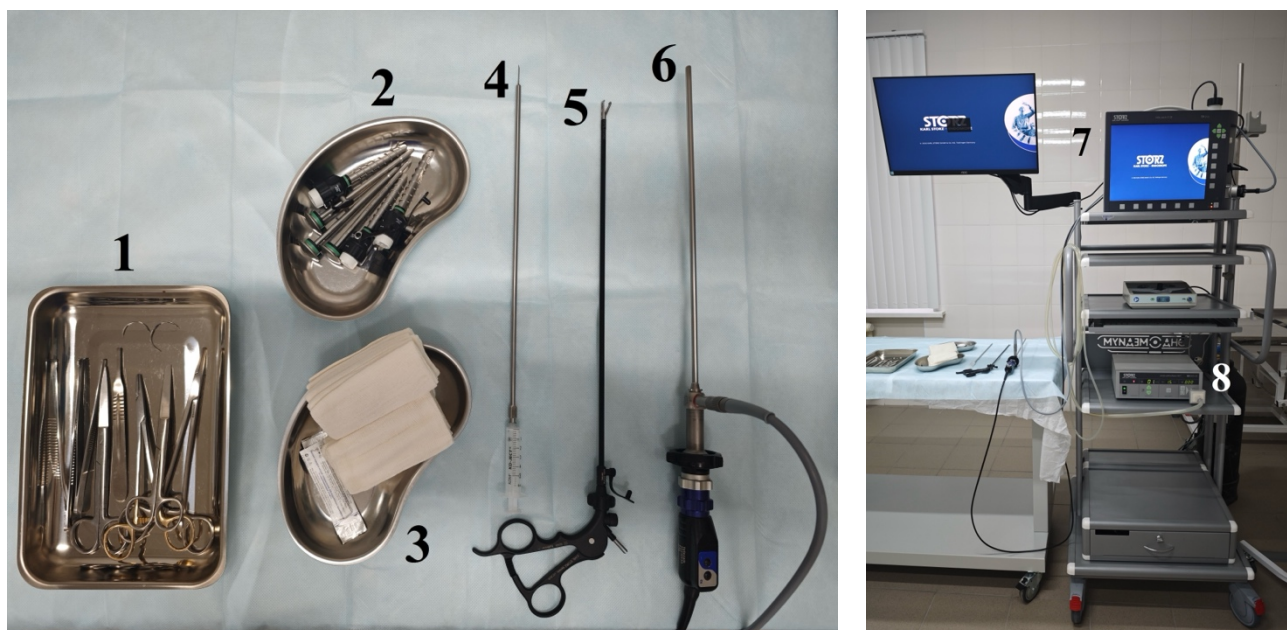


Рисунок 3. Комплект оборудования для проведения L-OPU у овец (фото авторов)

Примечание: 1 – набор хирургических инструментов (ручка для скальпеля, остро-тупоконечные ножницы, хирургические зажимы, иглодержатель, пинцет, иглы); 2 – троакары 3 шт с острым и тупым стилетом; 3 – марлевые салфетки и одноразовые лезвия для скальпеля; 4 – игла для сбора ооцитов со шприцом 5 мл; 5 – щипцы эндоскопические; 6 – эндоскоп; 7 – монитор для визуализации; 8 – инсуффлятор для нагнетания газа в брюшную полость

Целый ряд исследований был посвящен поиску оптимальных протоколов стимуляции яичников и временных режимов аспирации фолликулов с целью увеличения числа пригодных для аспирации фолликулов, повышения количества и улучшения качества извлекаемых ооцитов. Так, Baldisseri H. с соавт. [33] проводили стимуляцию яичников посредством внутримышечной инъекции гипоталамического экстракта свиньи с соотношением фолликулостимулирующего гормона (ФСГ) и лютеинизирующего гормона (ЛГ) 50:50. Овцематки были предварительно синхронизированы с использованием интравагинальных губок, содержащих 60 мг синтетического аналога прогестерона медроксипрогестерон ацетата (МПА). Извлечение ооцитов проводили через 14 дней после введения губок. В первом эксперименте гонадотропины были использованы в суммарной дозе 125 МЕ ФСГ и 125 МЕ ЛГ. В контрольной группе введение препарата ФСГ/ЛГ осуществляли 4-кратно, начиная за 48 часов до проведения аспирации фолликулов с постепенным уменьшением дозы через каждые 12 часов ($n=71$). В опытной группе выполняли однократную инъекцию за 24 часа до проведения пункции фолликулов ($n=71$). Всего было аспирировано 1013 фолликулов, из которых было получено 805 яйцеклеток, что соответствует степени извлечения в 79,5%. Среднее число аспирированных фолликулов на одну овцу составило $13,2 \pm 5,6$, а среднее число извлеченных яйцеклеток – $10,5 \pm 5,2$. Из общего числа извлеченных яйцеклеток 482 яйцеклетки (60%) были признаны пригодными для дальнейшего культивирования *in vitro*. Доля выбракованных ооцитов в обеих группах была примерно одинаковой (37,4% против 44,4%). Причиной выбраковки ооцитов в обеих группах было отсутствие слоев клеток кумулюса. Авторы не выявили достоверных различий между группами в степени созревания ($81,6 \pm 5,3\%$ против $77,4 \pm 10,3\%$), степени дробления ($60,6 \pm 20,8\%$ против $61,4 \pm 23,4\%$) и доле бластоцист ($20,8 \pm 18,2\%$ против $13,1 \pm 10,3\%$). Однако, в контрольной группе по сравнению с опытной группой у большей доли животных была получена, по крайней мере, 1 нормальная бластоциста (56,4 против 31,6%; $P < 0,05$).

Во втором эксперименте овцы были синхронизированы с использованием той же схемы. Контрольная группа ($n=71$) была аналогична эксперименту 1, в то время как овцематкам опытной группы ($n=71$) было введено 62,5 МЕ ФСГ, 62,5 МЕ ЛГ и 500 МЕ хорионического гонадотропина лошадей (лХГ) за один прием за 24 часа до извлечения ооцитов. Было аспирировано 928 фолликулов, из которых было извлечено 717 яйцеклеток, что соответствует степени извлечения 77,3%. Общий ответ на стимуляцию составил в среднем на одну овцу $14,3 \pm 5,3$ пунктированных фолликула, из которых было извлечено $11,0 \pm 5,0$ ооцитов. Из общего числа извлеченных яйцеклеток, 409 (57%) были отобраны для культивирования *in vitro*. Доля выбракованных яйцеклеток не различалась между контрольной и опытной группами (43,7% против 41,8%). Авторы не выявили различий между группами в компетенции ооцитов к развитию *in vitro*: степень созревания в контрольной и опытной группах составила $80,9 \pm 5,6\%$ против $73,3 \pm 15,3\%$, степень дробления – $76,8 \pm 19,9\%$ против $79,7 \pm 22,6\%$, доля бластоцист – $19,2 \pm 15,3\%$ против $23,3 \pm 10,7\%$, процент овцематок, у которых была получена, по крайней мере, 1 нормальная бластоциста – 55,9 против 51,6%. Таким образом, не было обнаружено значительных различий в эффективности способов гормональной обработки, что свидетельствует о том, что уменьшение временного интервала между стимуляцией гонадотропинами и аспирацией фолликулов не влияет на количество извлеченных яйцеклеток или степень их развития до стадии бластоцисты в условиях *in vitro*.

Stangl M. с соавт. [46] проводили исследование влияния режима проведения серии последовательных сеансов L-OPU, а также использования различных схем гормональной стимуляции на результативность L-OPU. Исследования проводили на восточно-фризских молочных овцах в возрасте 1 года ($n=20$), разделенных на 4 группы (А, В, С и D). Животным в группе А проводили пункцию фолликулов два раза в неделю (2/w), в группе В – один раз в неделю (1/w). В группе С OPU проводили в режиме 1/w, при этом за 48 ч до проведения каждой процедуры OPU выполняли гормональную стимуляцию однократной дозой 1500 МЕ ГСЖК (Folligon®, Intervet, Boxtmeer, Голландия). Овец группы D также обрабатывали ГСЖК по аналогичной схеме, при этом OPU проводили каждые две недели. Сразу после OPU стимулированным овцам из групп С и D вводили 2,5 мл моноклональных антител против ГСЖК (Neutra PMSG® iv, Intervet), чтобы избежать нежелательных побочных эффектов или выработки антител против ГСЖК. Все исследования проводились вне полового сезона в течение 10 недель. При проведении последующих сеансов OPU троакары вставляли на расстоянии 1-2 см от предыдущих разрезов или каудальнее них. Всего за 10 недель было проведено 216 сеансов L-OPU, в ходе которых было аспирировано 1978 фолликулов и извлечено 1098 яйцеклеток, что составило 55,5%. Один сеанс L-OPU длился около 20 минут. Авторами не было обнаружено достоверных различий между группами в степени извлечения ооцитов (варьировала от 51,1 to 57,1%) и количестве извлеченных ооцитов, а также доле ооцитов, пригодных для культивирования *in vitro* (от 65 to 70%). После проведения L-OPU 15 из 20 овец стали суягными после естественной случки с одним и тем же бараном, в том числе 5 – в группе А, 1 – в группе В, 4 – в группе С и 5 – в группе D. На основании полученных данных был сделан вывод, что проведение OPU один раз в неделю с использованием обработки ГСЖК/антиГСЖК является наиболее эффективным и может быть рекомендовано для использования в программах получения ооцитов. Метод обеспечивает получение значительного количества высококачественных ооцитов и, кроме того, он способствует сохранению репродуктивной способности животных-доноров.

Результаты некоторых исследований, проведенных на крупном рогатом скоте, свидетельствуют, что снижение доз ФСГ может улучшить качество яйцеклеток, поскольку более высокие дозы могут привести к быстрому и аномальному развитию фолликулов [74]. Поэтому Berlinguer F. et al. [75] было проведено исследование влияния постоянных и

снижающихся доз ФСГ на результативность L-OPU. Овец породы Сарда ($n=17$) разделили на три группы: группа А – без гормональной обработки (15 сеансов L-OPU); В – постоянные дозы ФСГ (18 сеансов L-OPU); С – снижающиеся дозы ФСГ (16 сеансов L-OPU). Доноров групп В и С синхронизировали с использованием интравагинальных губок в течение 7 дней. ФСГ в суммарной дозе 96 МЕ вводили четырехкратно через 12 ч., начиная с 5-го дня. L-OPU проводили через 12 ч. после введения последней дозы ФСГ. В контрольной группе среднее число фолликулов было достоверно ($p<0,05$) ниже, чем в опытных группах: 11,1 фолликулов против 16,3 в группе В и 19,8 фолликулов – в группе С. С другой стороны, число фолликулов размером >5 мм было достоверно ($p<0,01$) выше в группе С, что демонстрирует, что данный протокол стимулирует рост большей популяции фолликулов по сравнению с группой В. В контрольной группе было обнаружено больше фолликулов диаметром <2 мм ($p<0,01$). Различий в качестве ооцитов между группами выявлено не было. Исследуемые группы характеризовались аналогичными значениями созревания (90,9, 85,7 и 87,7%) и доли оплодотворения ооцитов (75,2, 80,9 и 83,7%). При этом в группе В был отмечен достоверно ($p<0,01$) более высокий выход бластоцист по сравнению с группами С и А: 20,4 против 11,8 и 13,7%, соответственно). После витрификации, оттаивания и культивирования *in vitro* в течение 72 ч. доля вылупления была достоверно ($p<0,01$) выше в группах А (87,5%) и В (90,5%) по сравнению с группой С (66,7%). В группах А и В выявлено достоверно ($p<0,001$) более высокое число клеток по сравнению с группой С: $217,6\pm 26,5$ и $203,0\pm 33,2$ против $147,5\pm 20,2$ клеток, в то время как различий в доле клеток внутренней клеточной массы между группами выявлено не было: $35,6\pm 3,8$, $37,1\pm 4,6$ и $36,6\pm 6,7\%$ в группах А, В и С, соответственно. По результатам проведенных исследований был сделан вывод, что использование постоянных доз ФСГ для стимуляции яичников овец-доноров позволяет получать ооциты лучшего качества, а полученные бластоцисты характеризуются лучшей криорезистентностью по сравнению с использованием снижающихся доз ФСГ.

Morton K.M. et al. [71] исследовали эффект стимуляции ФСГ на число овариальных фолликулов и извлеченных ооцитов, а также качество ооцитов и их развитие *in vitro*. Процедуры OPU проводили трехкратно на взрослых овцах с гормонально синхронизированным половым циклом ($n=4$). Для синхронизации использовали губки, пропитанные прогестагеном (40 мг Ova-Gest; Bioniche Animal Health Australasia Pty. Ltd., Австралия; L-OPU 1 и 3) или имплантаты синтетического прогестагена – норгестомета (3,0 мг Crestar; Intervet Bendigo, Австралия; OPU 2), которые оставались во влагалище в течение 14 дней для подавления выброса эндогенного ЛГ и извлекались непосредственно перед проведением L-OPU. Для стимуляции роста фолликулов за 36 часов до L-OPU выполняли внутримышечное введение 400 МЕ ГСЖК (Прегнекол®; Bioniche). Половине овцематок одновременно с введением ГСЖК осуществляли однократную внутримышечную инъекцию 80 мг свиного ФСГ (p-FSH; Фоллтропин®, Bioniche). Было установлено, что обработка ФСГ увеличивало число пригодных к аспирации фолликулов до 13,5 против 7,1 фолликулов в среднем на одного донора и число полученных ОКК – до 7,6 против 2,8 ОКК. Отмечены достоверные различия между отдельными донорами в числе фолликулов ($p<0,05$). Степень извлечения ооцитов составила соответственно 56,2 против 38,8%. Инъекции ФСГ не оказывали негативного влияния на качество ооцитов: доля ооцитов категории I и II составила 81,8% при использовании ФСГ и 85,7% – в контроле. Интересно, что число фолликулов в группе ярок, обработанных ФСГ, не различалось между повторяющимися процедурами OPU, в то время как в контрольной группе число аспирированных фолликулов снижалось. Проведение повторяющихся процедур OPU не оказывало влияния на качество ооцитов. Степень дробления и доля бластоцист между группами достоверно не различалась и составила соответственно 58,9 и 44,9% при использовании ФСГ и 79,2 и 50,0% – в контрольной группе. В целом, за весь период эксперимента от животных, обработанных

ФСГ, было получено 19 эмбрионов против 12 эмбрионов в контроле, что составляет соответственно 1,58 против 1,00 эмбрионов в расчете на сеанс OPU.

Teixeira P.P.M. et al. [67] исследовали влияние числа повторяющихся процедур на результативность L-OPU у овец породы Санта-Инн. Для синхронизации половой охоты использовали МРА с последующим однократным введением 80 мг сФСГ и 300 МЕ лХГ. L-OPU проводили через 36 ч. с интервалом между сеансами 7 дней. Было показано, что проведение девяти последовательных сеансов L-OPU не оказывало достоверного влияния на показатели результативности L-OPU. Среднее число визуализированных фолликулов, аспирированных фолликулов и извлеченных ооцитов составило соответственно $13,2 \pm 2,0$, $11,3 \pm 3,0$ и $5,8 \pm 2,3$ со степенью извлечения 51,7%. Различий в качестве ооцитов между сеансами выявлено не было. Было установлено, что проведение повторяющихся сеансов L-OPU не оказывало негативного влияния на состояние яичников.

Было показано, что существенное влияние на результативность OPU оказывает порода овец [72]. Синхронизацию полового цикла проводили с использованием CIDR в дозе 0,3 мг прогестерона. Для стимуляции яичников, начиная с 8-го дня после введения CIDR, проводили 4-кратное i.m. введение ФСГ/ЛГ (Pluset, Hertape Calier, Бразилия) в дозе 50 МЕ с интервалом 12 ч. (в суммарной дозе 200 МЕ). При проведении 1-й инъекции ФСГ/ЛГ дополнительно вводили 125 мкг d-клопростенола, при проведении третьей инъекции ФСГ/ЛГ дополнительно вводили 400 МЕ лХГ. Аспирацию проводили через 27-36 ч. после введения лХГ. Было показано, что среднее число ооцитов, полученных в расчете на сеанс L-OPU, составило 8,8 ооцитов – у овец породы Санта Инн, 11,3 ооцитов – у овец породы Дорпер, 7,6 ооцитов – у овец породы Белый Дорпер, 8,2 ооцитов – у овец породы Лакауна. Число ооцитов, пригодных для культивирования *in vitro*, составило соответственно 7,3, 9,2, 6,4 и 7,1 ооцитов, число полученных эмбрионов – 4,0, 7,6, 5,0 и 4,5 эмбрионов, степень суягности после пересадки эмбрионов – 36,7%, 18,4%, 23,6% и 25,9%.

Lahez B. et al. [34] исследовали влияние стимуляции яичников на результативность L-OPU у овец с различными генотипами по гену костного морфогенетического белка (BMP15), ассоциированного с повышенной степенью овуляции. Исследуемая выборка была представлена группой овец-носителей мутантного аллеля FecX (генотип подверг, n=8) и животными – не носителями (генотип ++, n=8). Пункции подвергали все фолликулы диаметром более 3 мм. Было показано существенное влияние стимуляции ФСГ на число пунктированных фолликулов, в то время как генотип животных по FecX, напротив, не оказывал достоверного влияния на данный показатель. Число полученных ооцитов при использовании ФСГ составило соответственно 17,4 и 14,3 ооцитов у овец с генотипом R+ и ++, при отсутствии обработки ФСГ – соответственно 10,4 и 10,2 ооцитов. Степень извлечения ооцитов в исследованных группах варьировала от 52,0 до 68,2%. В группе овец, которым стимулировали яичники с помощью ФСГ, наблюдалась более высокая степень извлечения ооцитов по сравнению с контрольной группой животных, не подвергшихся гормональной обработке. Число полученных ооцитов при использовании стимуляции яичников в группе овец, стимулированных ФСГ, составило 11,8 ооцитов для генотипа R и 8 ооцитов для генотипа ++, что превышало достигнутые значения показателей в группе не стимулированных овец – 5,9 и 5,4 ооцитов соответственно. У овец, обработанных ФСГ, отмечалась более высокая компетенция ооцитов к развитию *in vitro*, что выражалось в большей доле полученных бластоцист: 33,1% (генотип R+) и 31,3% (генотип ++) по сравнению с группой без использования гормональной стимуляции: 27,3 и 21,9% соответственно. Анализ полученных данных в аспекте генотипов по BMP15 при отсутствии различий в доле полученных бластоцист показал получение достоверно большего числа эмбрионов в среднем за сеанс OPU у овец с генотипов R+ (+0,75; $p < 0,005$) при отсутствии достоверных различий в соотношении рождения потомства: 40,4 против 36,4%.

Teixeira P.P.M. et al. [54] исследовали влияние различных схем гормональной стимуляции на результативность L-OPU у 4-8-недельных ярок-отъемышей породы Санта-Инн. Для индукции фолликулярной волны были использованы интравагинальные губки медроксипрогестерона. Для стимуляции яичников использовали парентеральное введение ЛХГ и ФСГ. Всех животных разделяли на шесть групп. Группа CCN не подвергалась гормональной обработке; группа GCI получала только интравагинальные имплантаты. В четырех оставшихся группах проводили стимуляцию яичников: группа G80U – однократное введение 80 мг сФСГ; группа G80M – 4 дозы по 20 мг сФСГ; группа G160U – однократное введение 160 мг сФСГ; группа G160M – 4 дозы по 40 мг сФСГ. Число полученных ооцитов в вышеуказанных группах составило соответственно $1,1 \pm 1,6$, $1,1 \pm 1,8$, $4,6 \pm 3,2$, $2,2 \pm 0,8$, $5,8 \pm 3,1$ и $3,0 \pm 2,0$ ооцитов; доля пригодных ооцитов (категории I и II) – соответственно 57,0%, 14,2%, 51,7%, 18,0%, 70,2% and 33,3%. Полученные результаты показывают возможность использования 4-8-недельных ярок для получения ооцитов посредством L-OPU, при этом использование однократной инъекции повышенной дозы сФСГ (160 мг) является более предпочтительным.

Исследование, проведенное группой ученых из Китая [36], было направлено на изучение влияния длительного использования рекомбинантного овечьего ФСГ, режима проведения сеансов и породы доноров на результативность L-OPU. Эксперименты были проведены на пяти различных породах овец с применением разнообразных схем стимуляции яичников. Синхронизация полового цикла у всех доноров проводилась с использованием CIDR (Pharmacia & Upjohn, Австралия) в течение 13 дней. Яйцеклетки извлекали посредством L-OPU через 12 ч после удаления CIDR. В первом эксперименте животным группы А вводили 6 последовательных i.m. инъекций снижающихся доз гипофизарного ФСГ (Саньшэн, Нинбо, Китай) с интервалом 12 ч.: 95 МЕ на 11-й и 11,5-й дни, 70 МЕ – на 12-й и 12,5-й дни и 45 МЕ – на 13-й и 13,5-й дни. Животным группы В вводили 6 доз ФСГ в количестве 70 МЕ. Животных группы С стимулировали двумя инъекциями по 8 мг рекомбинантного овечьего ФСГ пролонгированного действия, роФСГ (Youlian Kang Pharmaceutical Technology Co., Ltd., Китай) на 11-й и 12-й дни. Животных группы D стимулировали однократным введением 8 мг роФСГ за 48 ч до удаления CIDR (на 11-ый день). Животные группы Е не подвергались стимуляции ФСГ. Было установлено, что среднее число извлеченных ооцитов (20.9 ± 0.5), среднее число жизнеспособных ооцитов (17.2 ± 0.4) и среднее число полученных бластоцист (7.0 ± 0.2) в группе С было достоверно выше, чем в группах D и E и аналогично значениям показателей в группах А и В.

Во втором эксперименте, который проводился на 125 овцах породы суффолк в течение 12 месяцев, было изучено влияние режима использования доноров на результативность L-OPU. Для синхронизации полового цикла и стимуляции яичников использовали протокол группы С. Донорам 1-ой группы ($n=47$) проводили L-OPU в режиме один раз в месяц в течение 12 месяцев (двенадцать последовательных сеансов L-OPU). Доноры 2-й группы ($n=46$) подвергались L-OPU каждые 2 месяца в течение 1 года (шесть сеансов L-OPU). На донорах 3-й группы L-OPU выполняли каждые 3 месяца в течение 1 года (четыре сеанса L-OPU). Контрольная группа ($n=125$) подвергалась L-OPU один раз в год (один сеанс L-OPU). По завершении эксперимента у всех доноров не было выявлено долгосрочных репродуктивных проблем и инфекции яичников, а также наблюдались нормальная половая цикличность и способность к овуляции. Анализ полученных данных не выявил различий в выходе ооцитов и их компетенции к развитию *in vitro* при проведении сеансов L-OPU с интервалом 1, 2 и 3 месяца [36].

В третьем эксперименте доноры пяти различных пород, включая суффолк ($n=352$), восточно-фризскую ($n=91$), восточно-фризская х китайско-монгольская ($n=23$), дорпер ($n=221$) и тексель ($n=66$) были подвергнуты L-OPU с использованием аналогичного

протокола в эксперименте 2. Сеансы L-OPU проводили с интервалом 30 дней, в результате чего в течение экспериментального периода было проведено в общей сложности 4785 сеансов L-OPU, в том числе в аспекте вышеназванных пород – соответственно 2668, 266, 103, 1291 и 457 сеансов. Было установлено, что кроссбредные овцы восточно-фризская х китайско-монгольская и чистопородные восточно-фризские овцы имели больше извлеченных и жизнеспособных ооцитов по сравнению с тремя другими породами. Среднее число полученных бластоцист было наибольшим у кроссбредных овец – 8.1 ± 0.3 ($p < 0,05$). На основании результатов проведенных исследований был сделан вывод, что долговременная стимуляция с использованием роФСГ в сочетании с проведением 12 сеансов L-OPU в течение года позволяет максимизировать продукцию эмбрионов от элитных доноров в условиях фермы вне зависимости от сезона размножения [36].

Результаты исследований влияния различных схем подготовки и технологических режимов использования доноров на показатели результативности L-OPU обобщены в таблице 4.

Таблица 4. Влияние технологических параметров на результативность L-OPU у овец

Схема подготовки и технологический режим использования доноров	Число фолликулов / число ОКК	Извлечение, % ¹	Дробление, % ²	Выход бластоцист, % ³	Ссылка
Д0 – Д14: 60 мг МРА (ИБГ) Д12 – Д14: 125 МЕ ФСГ, 125 МЕ ЛГ (4 x i.m. через 12 ч) Д14: L-OPU, n=71	14,3 / 11,3	81,6±5,3	60,6±20,8	20,8±18,2	[33]
Д0 – Д14: 60 мг МРА (ИБГ) Д13: 125 МЕ ФСГ, 125 МЕ ЛГ (1x i.m.) Д14: L-OPU, n=71		77,4±10,3	61,4±23,4	13,1±10,3	
Д0 – Д14: 60 мг МРА (ИБГ) Д12 – Д14: 125 МЕ ФСГ, 125 МЕ ЛГ (4 x i.m. через 12 ч) Д14: L-OPU, n=71	13,1 / 10,1	80,9±5,6	76,8±19,9	19,2±15,3	
Д0 – Д14: 60 мг МРА (ИБГ) Д13: 62,5 МЕ ФСГ, 62,5 МЕ ЛГ, 500 МЕ лХГ (i.m.) Д14: L-OPU, n=71		73,3±15,3	79,7±22,6	23,3±10,7	
L-OPU: 2/w (10 недель), n=5	6,8 / 3,8	55,2	–	–	[46]
L-OPU: 1/w (10 недель), n=5	8,6 / 4,9	57,1	–	–	
Каждые 1/w (10 недель), n=5 Д0: 1500 МЕ лХГ Д2: L-OPU + 2,5 мл анти-лХГ	12,2 / 7,0	57,5	–	–	

Каждые 2w (10 недель), n=5 Д0: 1500 МЕ ГСЖК Д2: L-OPU + 2,5 мл анти-лХГ	14,9 / 7,6	51,1	–	–	
Контроль (n=5; 3х ч/з 14 сут.)	11,1±6,1 / 10,1	91,0	75,2	8,1	[75]
Д0 – Д7: Chronogest (ИБГ) Д5, Д5,5, Д6, Д6,5: 4 x 24 МЕ ФСГ Д7: L-OPU (n=6; 3х ч/з 14 сут.)	16,3±8,1 / 15,2	93,2	80,9	23,0	
Д0 – Д7: Chronogest (ИБГ) Д5: 38,8 МЕ ФСГ Д5,5: 28,8 МЕ ФСГ Д6: 19,2 МЕ ФСГ Д6,5: 9,6 МЕ ФСГ Д7: L-OPU (n=6; 3х ч/з 14 сут.)	19,8±8,8 / 16,9	85,2	83,7	15,0	
Д0 – Д14: Р4 (40 мг Ova-Gest), ИБГ или Norgestomet (3,0 мг Crestar), имплантаты Д12: 400 МЕ ГСЖК Д14: L-OPU (n=4)	7,1 / 2,8	56,2	79,2	50,0	[71]
Д0-Д14: Р4 – 40 мг Ova-Gest (ИБГ) или Norgestomet (3,0 мг Crestar), имплантаты Д12: 400 МЕ ГСЖК + 80 мг ФСГ Д14: L-OPU (n=4)	13,5 / 7,6	38,8	58,9	44,9	
Д0 125 мг PGF2α Д8: 125 мг PGF2α Д13: 30 мг FGA (ИБГ) Д25, Д32: L-OPU + замена ИБГ	10,4±1,1 ^a / 5,9±0,6 ^a 10,2±1,1 ^b / 5,4±0,6 ^b	59,2±3,7 ^a 52,0±3,7 ^b	84,0 ^a 85,4 ^b	27,3 ^a 21,9 ^b	[34]
Д0 125 мг PGF2α Д8: 125 мг PGF2α Д13: 30 мг FGA (ИБГ) Д36,5: 125 мкг Cloprostenol + 8 мг сФСГ Д37: 8 мг сФСГ Д37,5, Д38: 2 x 6 мг сФСГ Д38,5: 4 мг сФСГ Д39: L-OPU + замена ИБГ Д43,5: 125 мкг Cloprostenol + 8 мг сФСГ Д44: 8 мг сФСГ Д44,5, Д45: 2 x 6 мг сФСГ Д45,5: 4 мг сФСГ Д46: L-OPU	17,4±1,3 ^a / 11,8±0,8 ^a 14,3±1,3 ^b / 8,0±0,9 ^b	68,2±2,5 ^a 56,5±2,6 ^b	87,8 ^a 84,8 ^b	33,1 ^a 31,3 ^b	
Контроль (без гормональной обработки)	5,6±1,9 / 1,1±1,6	19,6	0,0		[54]
Д0-Д6: 60 мг МРА (ИБГ)	7,3±4,5 / 1,1±1,8	15,0	0,0		
Д0-Д6: ИБГ 60 мг МРА Д5: 300 МЕ лХГ Д7: 300 МЕ лХГ + 80 мг ФСГ Д9: L-OPU	9,4±1,6 / 4,6±3,2	48,9	16,6		

Д0-Д6: 60 мг МРА (ИБГ) Д5: 300 МЕ лХГ Д7: 300 МЕ лХГ + 20 мг ФСГ, Д7,5, Д8, Д8,5: 3 x 20 мг ФСГ, Д9: L-OPU	7,8±2,4 / 2,2±0,8	37,5	33,3		
Д0-Д6: 60 мг МРА (ИБГ) Д5: 300 МЕ лХГ Д7: 300 МЕ лХГ + 160 мг ФСГ Д9: L-OPU	8,1±3,4 / 5,8±3,1	71,6	63,6		
Д0-Д6: 60 мг МРА (ИБГ) Д5: 300 МЕ лХГ Д7: 300 МЕ лХГ + 40 мг ФСГ, Д7,5, Д8, Д8,5: 3 x 40 мг ФСГ, Д9: L-OPU	9,0±2,6 / 3,0±2,0	33,3	46,1		
Д0 – Д13: CIDR Д13,5: L-OPU	12,4±0,2 / 10,6±0,3	73,4±0,9	–	41,3	
Д0 – Д13: CIDR Д11, Д11,5: 2 x 95 МЕ ФСГ Д12, Д12,5: 2 x 70 МЕ ФСГ Д13, Д13,5: 2 x 45 МЕ ФСГ Д13,5: L-OPU	22,2±0,4 / 20,5±0,3	73,2±0,3	–	39,8	
Д0 – Д13: CIDR Д11, Д11,5, Д12, Д12,5, Д13, Д13,5: 6 x 70 МЕ ФСГ Д13,5: L-OPU	21,8±0,5 / 20,7±0,6	71,0±0,6	–	40,1	[36]
Д0 – Д13: CIDR Д11: 8 мг роФСГ Д12: 8 мг роФСГ Д13,5: L-OPU	22,6±0,2 / 20,9±0,5	74,4±0,5	–	40,8	
Д0 – Д13: CIDR Д11: 8 мг роФСГ Д13,5: L-OPU	18,8±0,3 / 17,6±0,4	72,8±0,7	–	39,6	

Примечание: ОКК – ооцит-кумулясные комплексы; Д – день введения препарата (день введения первого препарата обозначен как день 0; число после Д указывает на порядковый день введения препарата по отношению к Д0); МРА – синтетический аналог прогестерона медроксипрогестерон-ацетат; ИБГ – интравагинальная губка; ФСГ – фолликулостимулирующий гормон; ЛГ – лютеинизирующий гормон; лХГ – хорионический гонадотропин лошадей; CIDR – интравагинальное устройство для дозирования препаратов; i.m. – внутримышечная инъекция; сФСГ – свиной ФСГ; роФСГ – рекомбинантный овечий ФСГ ^aгенотип R+ по FecX, ^bгенотип ++ по FecX

Таким образом, метод лапароскопической аспирации фолликулов (L-OPU) является малоинвазивной и надежной процедурой, обеспечивающей возможность прижизненного извлечения ооцитов у овец. Метод позволяет проводить визуальное обследование яичников, выполнять пункцию фолликулов, не сопровождается хирургическими осложнениями и обеспечивает быстрое восстановление самок после процедуры. По сравнению с методом хирургического вымывания эмбрионов после полиовуляции (МОЕТ), L-OPU обладает преимуществами в виде меньшей инвазивности, сниженного послеоперационного стресса, возможности получения ооцитов от самок, не пригодных для МОЕТ (например, для раннего воспроизводства элитных самок до половой зрелости и, напротив, для воспроизводства старых животных, ставших бесплодными или неспособными

самостоятельно выносить беременность, но генетически ценных), возможности интенсивного использования самок для L-OPU с интервалом 7-14 суток. Важно отметить, что L-OPU не вызывает спаек или фиброза, которые могут возникнуть после многократного выполнения МОЕТ. Кроме того, метод L-OPU позволяет получать ооциты, пригодные для оплодотворения *in vitro*, в течение всего года вне периода размножения.

В качестве технологического приема, направленного на увеличение числа извлекаемых ооцитов за сеанс L-OPU, практикуется проведение гормональной синхронизации полового цикла с последующей стимуляцией яичников с целью увеличения популяции фолликулов, одновременно вступающих в стадию роста. Для синхронизации полового цикла находят применение использование интравагинальных устройств, содержащих прогестерон или прогестаген (например, CIDR, праймер, губки), которые используются в сочетании с простагландином или его аналогами (например, клопростенолом, динопростом). Для увеличения числа фолликулов, одновременно вступающих в стадию роста, применяют протоколы, основанные на использовании экзогенных гонадотропинов – фолликулостимулирующего гормона и / или хорионического гонадотропина лошадей, ранее известного как гонадотропин сыворотки жеребой кобылы. Для стимуляции яичников находят применение различные протоколы, эффективность которых различается между экспериментами, поэтому проведению L-OPU должно предшествовать определение оптимального протокола гормональной стимуляции яичников с учетом породных особенностей овец и доступных гормональных препаратов.

Хотя за 30 лет развития технологии L-OPU были достигнуты существенные успехи в отношении оптимизации технических и технологических параметров проведения процедуры, для широкого практического внедрения технологии необходимо проведение дальнейших исследований, направленных на повышение эффективности L-OPU с целью обеспечения устойчивого ответа на гормональную стимуляцию яичников и возможности проведения повторяющихся процедур L-OPU без существенной потери результативности при сохранении репродуктивных функций доноров, повышение количества извлекаемых ооцитов и их компетенции к развитию в системе *in vitro*, улучшение криорезистентности получаемых IVP-эмбрионов.

Литература.

1. Joao H. M. V. A new milestone has been reached: transfers of IVP embryos were over one million worldwide // Embryo Technology Newsletter. 2022. № 40 (4). P. 22-40.
2. Чинаров Р. Ю., Луканина В. А. Производство эмбрионов крупного рогатого скота с использованием прижизненно получаемых ооцитов: мировые тренды и перспективы (обзор) // Достижения науки и техники АПК. 2023. № 9. С. 31-38. doi: 10.53859/02352451_2023_37_9_31.
3. Smith C. Use of embryo transfer in genetic improvement of sheep // Animal Science. 1986. № 42(1). P. 81-88. doi:10.1017/S000335610001775X
4. Multiple factors affecting the efficiency of multiple ovulation and embryo transfer in sheep and goats / A. González-Bulnes, D. T. Baird, B. K. Campbell, M. J. Cocero, R. M. García-García, E. K. Inskeep, A. López-Sebastián, A. S. McNeilly, J. Santiago-Moreno, C. J. H. Souza, A. Veiga-López // Reprod. Fertil. Dev. 2004. № 16. P. 421–435.
5. New approaches to superovulation and embryo transfer in small ruminants / A. Menchaca, M. Vilariño, M. Crispo, T. de Castro, E. Rubianes // Reprod. Fertil. Dev. 2010. № 22. P. 113–118.
6. Luo J., Wang W., Sun S. Research advances in reproduction for dairy goats // Asian-Australas J. Anim. Sci. 2019. № 32. P. 1284–1295.
7. Advances and limitations of in vitro embryo production in sheep and goats / A. Menchaca, N. Barrera, P. C. dos Santos Neto, F. Cuadro, M. Crispo // Anim. Reprod. 2016. № 13. P. 273–278.

8. Laparoscopic techniques for the recovery and transfer of microinjected goat zygotes / B. Kühholzer, S. Müller, M. I. Prokofiev, L. K. Ernst, U. Besenfelder, G. Brem // *Theriogenology*. 1998. № 49. P. 245.
9. Cheng W. T. K., Moor R. M., Polge C. E. In vitro fertilization of pig and sheep oocytes matured in vivo and in vitro // *Theriogenology*. 1986. № 25. P. 14.
10. Advances in in vitro production of sheep embryos / J. Zhu, A. R. Moawad, C. Y. Wang, H. F. Li, J. Y. Ren, Y. F. Dai // *Int J Vet Sci Med*. 2018. № 27 (6). P. 15-26. doi: 10.1016/j.ijvsm.2018.02.003.
11. Can permeable super oxide dismutase mimetic agents improve the quality of frozen-thawed ram semen? / M. Forouzanfar, S. F. Ershad, S. M. Hosseini, M. Hajian, S. Ostad-Hosseini, A. Abid, M. Tavalaei, A. Shahverdi, A. V. Dizaji, M. H. N. Esfahani // *Cryobiology*. 2013. № 66 (2). P. 126–130.
12. In vitro fertilization of ovine oocytes vitrified by solid surface vitrification at germinal vesicle stage / A. R. Moawad, P. Fisher, J. Zhu, I. Choi, Z. Polgar, A. Dinnyes, K. H. S. Campbell // *Cryobiology*. 2012. № 65(2). P. 139–44. Doi: 10.1016/j.cryobiol.2012.04.008.
13. A novel technique for in vitro maturation of sheep oocytes in a liquid marble microbioreactor / S. Ledda, A. Idda, J. Kelly, F. Ariu, L. Bogliolo, D. Bebbere // *J Assist Reprod Genet*. 2016. № 33(4). P. 513-8.
14. In vitro Developmental Competence of Adult Sheep Oocytes Treated with Roscovitine / L. F. Crocomo, F. Ariu, L. Bogliolo, D. Bebbere, S. Ledda, S. D. Bicudo. // *Reprod Domest Anim*. 2016. № 51(2). P. 276–281. <http://dx.doi.org/10.1111/rda.12677>.
15. Prediction of oocyte developmental competence in ovine using glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PDH) activity determined at retrieval time / A. Mohammadi-Sangcheshmeh, M. Soleimani, H. Deldar, M. Salehi, S. Soudi, S. M. Hashemi, K. Schellander, M. Hoelker // *J Assist Reprod Genet*. 2012. № 29(2). P. 153–8. <http://dx.doi.org/10.1007/s10815-011-9625-6>.
16. Production of good-quality blastocyst embryos following IVF of ovine oocytes vitrified at the germinal vesicle stage using a cryoloop / A. R. Moawad, J. Zhu, I. Choi, D. Amarnath, W. Chen, K. H. S. Campbell. // *Reprod Fertil Dev*. 2013. № 25(8). P. 1204–1215. <http://dx.doi.org/10.1071/RD12215>.
17. Evaluation of two methods of in vitro production of ovine embryos using fresh or cryopreserved semen / R. Romao, C. C. Marques, M. C. Baptista, M. I. Vasques, J. P. Barbas, A. E. M. Horta, N. Carolino, D. E. Bettencourt, C. Plancha, P. Rodriguesc, R. M. Pereira // *Small Ruminant Res*. 2013. № 110. P. 36–41.
18. Developmental competence of ovine oocytes after vitrification: Differential effects of vitrification steps, embryo production methods, and parental origin of pronuclei / S. M. Hosseini, V. Asgari, S. Ostadhosseini, M. Hajian, H. R. Ghanaei, M. H. Nasr-Esfahani // *Theriogenology*. 2015. № 83(3). P. 366–376.
19. The Effect of Macromolecule Source and Type of Media During In vitro Maturation of Sheep Oocytes on Subsequent Embryo Development / S. Abolfazl, A. M. Ansari, A. Ebrahim, N. Hassan, M. Morteza, H. Banafsheh. // *J Reprod Infertil*. 2012. № 13(1). P. 9-13.
20. Cryotolerance of Day 2 or Day 6 in vitro produced ovine embryos after vitrification by Cryotop or Spatula methods / P. C. Dos Santos Neto, M. Vilariño, N. Barrera, F. Cuadro, M. Crispo, A. Menchaca // *Cryobiology*. 2015. № 70(1). P. 17–22.
21. Epidermal growth factormediated mitogen-activated protein kinase3/1 pathway is conducive to in vitro maturation of sheep oocytes / H. Ni, X. Sheng, X. Cui, M. Gu, Y. Liu, X. Qi, S. Xing, Y. Guo // *PLoS One*. 2015. № 10(3). e0120418. doi: 10.1371/journal.pone.0120418. eCollection.
22. Shirazi A., Motaghi E. The in vitro fertilization of ovine oocytes in the presence of oviductal cells and its effect on the expression of zygote arrest 1 (zar1) and subsequent embryonic development // *J Reprod Infertil*. 2013. № 14. P. 8–16.
23. Effect of sericin supplementation in maturation medium on cumulus cell expansion, oocyte nuclear maturation, and subsequent embryo development in Sanjabi ewes during the breeding season / F. Aghaz, H. Hajarian, H. K. Shabankareh, A. Abdolmohammadi // *Theriogenology*. 2015. № 84(9). P. 1631–1635.
24. Wang Z., Lin P., Yu S. Effects of ghrelin on developmental competence and gene expression of in vitro fertilized ovine embryos // *Theriogenology*. 2013. № 79(4). P. 695–701.

25. Cerium oxide nanoparticles (CeO₂ NPs) improve the developmental competence of in vitro-matured prepubertal ovine oocytes / F. Ariu, L. Bogliolo, A. Pinna, L. Malfatti, P. Innocenzi, L. Falchi, D. Bebbere, S. Ledda // *Reprod Fertil Dev.* 2017. № 29(5). P. 1046–1056. doi: 10.1071/RD15521.
26. The effect of media supplementation with angiotensin on developmental competence of ovine embryos derived from vitrified-warmed oocytes / M. M. Naderi, S. B. Boroujeni, A. Sarvari, B. Heidari, M. M. Akhondi, A. H. Zarnani, A. Shirazi // *Avicenna J Med Biotechnol.* 2016. № 8(3). P. 139–44.
27. Effect of oocyte quality on blastocyst development after in vitro fertilization (IVF) and intracytoplasmic sperm injection (ICSI) in a sheep model / M. G. Catalá, D. Izquierdo, M. Rodríguez-Prado, S. Hammami, M. T. Paramio // *Fertil Steril.* 2012. № 97(4). P. 1004–1008. doi: 10.1016/j.fertnstert.2011.12.043.
28. Blastocyst rate of in vitro embryo production in sheep is affected by season 2013/ L. Mara, D. Sanna, S. Casu, M. Dattena, I. M. Mayorga Muñoz // *Reprod Dom Anim.* 2014. № 49 (4). P. 37–48.
29. Effect of α -linoleic acid supplementation on in vitro maturation, embryo development and apoptotic related gene expression in ovine / E. Amini, R. Asadpour, L. Roshangar, R. Jafari-joozani // *Int J Reprod Biomed (Yazd).* 2016. № 14(4). P. 255–262.
30. Ghaffarilaleh V., Fouladi-Nashta A., Paramio M. T. Effect of α -linolenic acid on oocyte maturation and embryo development of prepubertal sheep oocytes // *Theriogenology.* 2014. № 82(5). P. 686–696.
31. Blastocyst development, MPF activity and ATP content of lamb oocytes supplemented with insulin–transferrin–selenium (ITS) and ascorbic acid at IVM / M. G. Catalá, M. Roura, D. Izquierdo, R. Morato, S. Hammami, M. T. Paramio // *Small Ruminant Res.* 2013. № 112(1–3). P. 103–107.
32. Dynamics of sperm subpopulations based on motility and plasma membrane status in thawed ram spermatozoa incubated under conditions that support in vitro capacitation and fertilization / O. Garcí'a-A'lvarez, A. Maroto-Morales, M. Ramo'n, E. del Olmo, P. Jimé'nez-Rabada'n, R. Ferná'ndez-Santos, L. Anel-Lo'pez, J. 'n Garde, A. J. Soler // *Reprod Fertil Dev.* 2014. № 26(5). P. 725–732. <http://dx.doi.org/10.1071/RD13034>.
33. In vitro production of sheep embryos using laparoscopic folliculocentesis: alternative gonadotropin treatments for stimulation of oocyte donors / H. Baldassare, C.C. Fumus, D.G. de Matos, H. Pessi // *Theriogenology.* 1996. № 45. P. 707–717.
34. Influence of the FecX(R) allele in heterozygous ewes on follicular population and outcomes of IVP and ET using LOPU-derived oocytes / B. Lahoz, J. L. Alabart, J. Folch, P. Sánchez, E. Echegoyen, M. J. Cocero // *Reprod Domest Anim.* 2013. № 48(5). P. 717–723. <http://dx.doi.org/10.1111/rda.12150>.
35. Cox J. F., Alfaro V. In Vitro Fertilization and Development of OPU Derived Goat and Sheep Oocytes // *Reprod Dom Anim.* 2007. № 42. P. 83–87. doi: 10.1111/j.1439-0531.2006.00735.x
36. Field outcomes of laparoscopic ovum pick-up combined with in vitro embryo production in sheep: Effects of long-acting recombinant ovine FSH pre-stimulation, collection frequency, and donor breed / Y. Song, N. Zhang, Y. Yue, D. Chen, C. Chou, L. An, L. Cheng, J. Zhang, J. Tian // *Domestic Animal Endocrinology.* 2024. № 87. 106826. Doi:10.1016/j.domaniend.2023.106826.
37. Paramio M. T., Izquierdo D. Recent advances in in vitro embryo production in small ruminants. *Theriogenology.* 2016. № 86.1 P. 52–159.
38. Wiczorek J., Koseniuk J., Cegla M. The repeatable method of laparoscopic ovum pick-up (OPU) in sheep: Clinical aspects and efficiency of the method // *Pol. J. Vet. Sci.* 2018. № 21. P. 803–810.
39. Production of transgenic goats by pronuclear microinjection of in vitro produced zygotes derived from oocytes recovered by laparoscopy / H. Baldassarre, B. Wang, N. Kafidi, M. Gauthier, N. Neveu, J. Lapointe, L. Sneek, M. Leduc, F. Duguay, J. F. Zhou, A. Lazaris, C. N. Karatzas // *Theriogenology.* 2003. № 59. P. 831–839.
40. Laparoscopic ovarian biopsy pick-up method for goats / F. A. S. Brandão, B. G. Alves, K. A. Alves, S. S. Souza, Y. P. Silva, V. J. F. Freitas, D. I. A. Teixeira, E. L. Gastal // *Theriogenology.* 2018. № 107. P. 219–225.
41. Nonsurgical embryo recovery and transfer in sheep and goats / J. F. Fonseca, J. M. Souza-Fabjan, M. E. Oliveira, C. R. Leite, P. M. Nascimento-Penido, F. Z. Brandão, K. C. Lehloenya // *Theriogenology.* 2016. № 86. P. 144–151.

42. Embryo production by ovum pick up from live donors / C. Galli, G. Crotti, C. Notari, P. Turini, R. Duchi, G. Lazzari // *Theriogenology*. 2000. № 55. P. 1341–1357.
43. Cogine Y. State of the art in sheep—Goat embryo transfer // *Theriogenology*. 1999. № 51. P. 105–116.
44. Laparoscopic recovery of oocytes from sheep / H. R. Tervit, J. F. Smith, L. T. McGowan, R. W. Wells, J. Parr // *Proc Aust Sot Reprod Biol*. 1992. № 24. P. 26.
45. Laparoscopic recovery of ovarian oocytes from slaughtered or living sheep / H. R. Tervit, J. F. Smith, L. T. McGowan, R. W. Wells, P. A. Pugh // *Proc Aust Sot Reprod Biol*. 1993. № 25. P. 60.
46. Repeated endoscopic ovum pick-up in sheep / M. Stangl, B. Kuhholzer, U. Besenfelder, G. Brem // *Theriogenology*. 1999. № 52. P. 709–716.
47. Roberts E. M. Endoscopy of the Reproductive Tract of the Ewe // *Proc. Aust. Sot. Anim. Prod*. 1968. № 1. P. 192.
48. Boyd J. S., Ducker M. J. A method of Examining the Cyclic Changes Occurring in the Sheep Ovary Using Endoscopy // *Vet. Rec*. 1973. № 93. P. 390-398.
49. Seeger K. Die Laparoskopie, eine Technik zur Routine-untersuchung des Genitaltrakts eim Schaf // *Tierarztl. Prax. L*. 1973. P. 295-299.
50. Snyder D.A., Dukelow W. R. Laparoscopic studies of ovulation, pregnancy diagnosis, and follicle aspiration in sheep // *Theriogenology*. 1974. № 6 (2). P. 143-148.
51. Direct Ovarian Observation in the Pig by Means of Laparoscopy / D. E. Wildt, S. Fujimoto, J. L. Spencer, W. R. Dukelow // *Reprod. Fertil*. 1973. № 35. P. 541-543.
52. Current status of embryo technologies in sheep and goat / Y. Cognie, G. Baril, N. Poulin, P. Mermillod // *Theriogenology*. 2003. № 59. P. 171–188.
53. Pattern of follicular development in sheep subjected to ovarian superstimulation after follicular ablation by laparoscopic ovum pick-up / R. Denadai, H. R. Leite, L. D. C. Bicudo, L. Rodello, E. Oba, S. D. Bicudo // *Ciência Rural*. 2017. №47. e20150704. Doi: 10.1590/0103-8478cr20150704.
54. Ovum pick-up technique in recently weaned ewe lambs subjected to ovarian stimulation / P. P. M. Teixeira, L. C. Padilha, A. S. L. da Silva, F. F. P. da Câmara Barros, L. N. Coutinho, M. A. M. Silva, F. N. Flôres, M. C. S. Lopes, D. P. Vrisman, M. E. B. A. M. da Conceição, W. R. R. Vicente // *Acta Sci. Vet*. 2015. № 43. P. 1-9.
55. Side access lopu in sheep-pilot study / R. A. R. Uscategui, R. S. M. Landers, R. P. Nociti, F. F. P. da Camara Barros, L. C. Padilha-Nakaghi, L. N. Coutinho, V. J. C. Santos, L. Canuto, C. F. Coelho, P. P. M. Teixeira, W. R. R. Vicente // *Reprod. Dom. Anim*. 2014. № 49, P. 90-90.
56. Comparison of two surgical approaches for Laparoscopic Ovum Pick Up in Ewes / R. S. G. Mariano, R. A. R. Uscategu, R. P. Nociti, F. F. P. C. Barros, V. J. C. Santos, L. N. Coutinho, L. C. Padilha-Nakaghi, P. D. A. Silva, P. P. M. Teixeira, W. R. R. Vicente // *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec*. 2019. № 71(3). P. 848-856.
57. Cardiac function and hypercarbia / J. P. Rasmussen, P. J. Dauchot, R. G. DePalma, B. Sorensen, G. Regula, A. H. Anton, J. S. Gravenstein // *Arch. Surg*. 1978. № 113. P. 1196-2000.
58. Pulmonary CO2 elimination during surgical procedures using intra- or extraperitoneal CO2 insufflation / C. E. Mullett, J. P. Viale, P. E. Sagnard, C. C. Miellet, L. G. Ruynat, H. C. Counioux, J. P. Motin, J. P. Boulez, D. M. Dargent, G. J. Annat // *Anaesth. Analg*. 1993. № 76. P. 622-626.
59. Punnonrn R., Viinaniaki O. Vasopressin release during laparnscopy: role of increased intra-abdominal pressure // *Lancet*. 1982. № 1. P. 175-176.
60. Hayden P., Cowman S. Anaesthesia for laparoscopic surgery // *Cont. Educ. Anesth. Critical Care Pain*. 2011. № 11. P. 177-180.
61. Efeitos do pneumoperitônio com ar e CO2 na gasometria de suínos / S. L. S. Lemos, J. M. Vinha, I. S. Silva, P. A. C. Novaes, M. F. Oliveira, G. B. Paula, C. C. Rebelo, M. L. Marinho // *Acta Cir. Bras*. 2003. № 18. P. 445-451.
62. Joris J. L. Anaesthesia for laparoscopic surgery. In: *Text Book of Anaesthesia*. 7th ed. Elsevier Health Sciences. 2009. P. 2185–2202.
63. Duke T., Steinacher S. L., Remedios A. M. Cardiopulmonary effects of using carbon dioxide for laparoscopic surgery in dogs // *Vet. Surg.*, 1996. № 25. P.77-82.

64. Hazebroek E. J., Bonjer H. J. Effect of patient position on cardiovascular and pulmonary function. In: WHELAN R. L.; FLESHMAN J. W.; FOWLER D. L. (Eds.). The sages perioperative care in minimally invasive surgery. New York: Springer. 2006. P. 410.
65. The effects of the lateral position on cardiopulmonary function during laparoscopic urological surgery / K. Fujise, K. Shingu, S. Matsumoto, A. Nagata, O. Mikami, T. Matsuda // *Anaesth. Anal.* 1998. №87. P.925- 930.
66. L-OPU in Goat and Sheep—Different Variants of the Oocyte Recovery Method / J. Wieczorek, J. Koseniuk, M. Skrzyszowska, M. Cegła // *Animals*. 2020. № 10. P. 658. doi:10.3390/ani10040658
67. Laparoscopic ovum collection in sheep: Gross and microscopic evaluation of the ovary and influence on oocyte production / P. P. M. Teixeira, L. C. Padilha, M. E. F. Oliveira, T. F. Motheo, A. S. L. da Silva, F. F. P. C. Barros, L. N. Coutinho, F. N. Flôres, M. C. S. Lopes, M. B. Bandarra, M. A. M. Silva, R. O. Vasconcelos, L. F. S. Rodrigues, W. R. R. Vicente // *Animal Reproduction Science*. 2011. № 127. P. 169–175. doi:10.1016/j.anireprosci.2011.08.001
68. Effects of oxygen supplementation in ewes subjected to laparoscopic ovum pick-up under total intravenous anesthesia / M. F. S. Silva, R. A. R. Uscategui, R. S. M. Landers, P. P. M. Teixeira, F. F. P. da Camara Barros, P. F. Marcusso, W. R. R. Vicente // *Acta Veterinaria Brasilica* March. 2023. № 17 (1). P. 21-27. DOI:10.21708/avb.2023.17.1.10392
69. Baldassarre H. Laparoscopic Ovum Pick-Up Followed by In Vitro Embryo Production and Transfer in Assisted Breeding Programs for Ruminants // *Animals*. 2021. № 11. P. 216. Doi:10.3390/ani11010216
70. Ovum Pick-up in Sheep: a Comparison between Different Aspiration Devices for Optimal Oocyte Retrieval / C. Rodríguez, L. Anel, M. Alvarez, E. Anel, J. C. Boixo, C. A. Chamorro, P. de Paz // *Reprod Dom Anim*. 2006. № 41. P. 106–113.
71. Repeat Ovum Pick-up and In Vitro Embryo Production from Adult Ewes with and without FSH Treatment / K. M. Morton, S. P. de Graaf, A. Campbell, L. M. Tomkins, W. M. Chis Maxwell, G. Evans // *Reprod Dom Anim*. 2005. № 40. P. 422–428.
72. Silva J. C. B., Okabe W. K., Traldi A. S. From cattle to sheep: a view of the difficulties and success of commercial in vitro production of sheep embryos // *Anim Reprod*. 2012. № 9(3). P. 195-200.
73. Technique for efficient recovery of sheep oocytes by laparoscopic folliculocentesis / H. Baldassarre, D. G. de Matos, C. C. Fumus, T. E. Castro, E. L. Cabrera Fischer // *Anim Reprod Sci*. 1994. № 35. P. 145-150.
74. Superovulation can reduce the developmental competence of bovine embryos / P. Blondin, K. Coenen, L. A. Guilbault, M. A. Sirard // *Theriogenology*. 1996. № 46. P. 1191-1203.
75. FSH different regimes affect the developmental capacity and cryotolerance of embryos derived from oocytes collected by ovum pick-up in donor sheep / F. Berlinguer, G. Leoni, L. Bogliolo, P. P. Pintus, I. Rosati, S. Ledda, S. Naitana // *Theriogenology*. 2004. № 61. P. 1477-1486.

УДК 636.22/.28.087.3:612.3:504.3

Роль факторов липидного питания в процессе метаногенеза у жвачных

Боголюбова Н.В., Некрасов Р.В.

ФГБНУ ФИЦ ВИЖ им. Л.К. Эрнста,
Московская обл., Россия

Аннотация. Изучение процесса метаногенеза в организме жвачных и возможность его регуляции связано не только с экологическим фактором воздействия на окружающую среду парниковых газов, но и преследует цели сокращения энергозатрат организма на образование метана. Предлагаются к использованию множество способов воздействия на процесс метаногенеза, связанных с алиментарными и генетическими факторами. Актуальными являются стратегии алиментарного характера, исключающие отрицательное воздействие на поедаемость кормов, процессы пищеварения, переваримость питательных веществ кормов. Целью настоящего обзора является обобщение современных данных о влиянии факторов липидного питания на образование метана у жвачных. В отличие от химических соединений, жиры имеют естественное происхождение, являются источником энергии и влияют на жирнокислотный профиль мяса и молока, способствуют усилению вкусовых качеств корма, что делает их включение в рацион животных не только безопасным, но и эффективным способом воздействия на образование метана. Воздействие жиров на метаногенез происходит посредством различных механизмов, включающих влияние на археи и простейших рубца, снижение переваримости кормов рационов и конкуренцию за водород для гидрогенизации. На метанообразование влияет степень насыщенности, длины цепи кислоты, дозировка включения в рацион, продолжительность скармливания, состав и качество основного рациона. Перспективным направлением является использование жира насекомых в рационах жвачных животных с целью воздействия на метаногенез. Несмотря на изученность вопроса использования жиров в питании жвачных с целью снижения метаногенеза, малоизученными остаются роль липидов на процесс метанообразования при различном составе рационов, информация о влиянии некоторых жиров в экспериментах *in vivo*, необходимость более глубокого изучения механизмов воздействия стратегий на продуктивность, здоровье животных.

Ключевые слова: метаногенез, жвачные животные, жиры рациона, жиры насекомых.

Для цитирования: Боголюбова Н.В., Некрасов Р.В. Роль факторов липидного питания в процессе метаногенеза у жвачных // Успехи наук о животных. 2025. № 1. С. 76—88. doi: 10.25687/3034-493X.2025.2.1.005

The role of lipid nutrition on the methanogenesis in ruminants

N.V. Bogolyubova, R.V. Nekrasov

L.K. Ernst Federal Research Center for Animal Husbandry
Moscow Region, Russia

Abstract. The study of the process of methanogenesis in the body of ruminants and the possibility of its regulation is associated not only with the environmental factor of the impact of greenhouse gases on the environment, but also pursues the goal of reducing the energy consumption of the body for the formation of methane. Many methods of influencing the process of methanogenesis related to nutritional and genetic factors are proposed for use. Nutritional strategies that exclude negative effects on feed intake, digestion processes, and digestibility of feed nutrients are relevant. The purpose of this review is to summarize current data on the influence of lipid nutrition factors on methane formation in ruminants. Unlike chemical compounds, fats are of natural origin, are a source of energy and affect the fatty acid profile of meat and milk, enhance the palatability of feed, which makes their inclusion in the diet of animals not only safe, but also an effective way to influence the formation of methane. The effects of fat on methanogenesis occur through a variety of mechanisms, including effects on rumen archaea and protozoa, decreased digestibility of diets, and competition for hydrogen for hydrogenation. Methane formation is affected by the degree of saturation, acid chain length, dosage included in the diet, duration of feeding, composition and quality of the main diet. A promising direction is the use of insect fat in the diets of ruminants in order to influence methanogenesis. Despite the study of the issue of using fats in the diet of ruminants in order to reduce methanogenesis, the role of lipids on the process of methane formation with different compositions of diets, information on the influence of some fats in *in vivo* experiments, and the need for a more in-depth study of the mechanisms of influence of strategies on the productivity and health of animals remain poorly understood.

Keywords: methanogenesis, ruminants, dietary fats, insect fats.

For citation: Bogolyubova NV, Nekrasov RV. The role of lipid nutrition on the methanogenesis in ruminants. Ernst Journal of Animal Science. 2025. 1: 76—88. Russian. doi: 10.25687/3034-493X.2025.2.1.005

На сегодняшний день проблема выделения парниковых газов широко обсуждается как в нашей стране, так и за рубежом. За последние 100 лет температура воздуха нижних слоёв атмосферы Земли поднялась на $0,8^{\circ}\text{C}$. Это слишком высокая скорость для естественных процессов, ранее в истории Земли такие изменения происходили в течение тысячелетий. За последние 15 лет средняя температура воздуха росла еще большими темпами — на $0,3-0,4^{\circ}\text{C}$ [1].

Согласно указу Президента РФ 145 от 28.02.2024 года, в ближайшее десятилетие одним из приоритетов научно-технологического развития следует считать направления, позволяющие получить значимые и научно-технические результаты, обеспечивающие «объективную оценку выбросов и поглощения климатически активных веществ, снижение их негативного воздействия на окружающую среду и климат, повышение возможности качественной адаптации экосистем...». В данном ключе актуальность приобретают исследования, направленные на разработку агротехнологий, способствующих снижению выделения парниковых газов жвачными животными без ущерба их продуктивным качествам и эффективности использования кормов рационов.

Согласно данным 2005 года, в общем выбросе метана от сектора сельского хозяйства жвачные животные в процессе ферментации выделяют 59% газа, при хранении навоза — 7%, выращивании риса — 20% и прочие источники — 14%. При этом на долю молочных коров приходится 49,6 % всех выбросов, на долю крупного рогатого скота (КРС) кроме коров — 36,2 %, на долю мелких жвачных животных (МРС) — 9,2%, свиней — 1,4% и прочих видов сельскохозяйственных животных — 3,6% [1]. Отмечено, что более высокопродуктивные животные выделяют метана на единицу продукции меньше, чем низко продуктивные. Производство метана в организме требует затрат большого количества энергии. Так, в зависимости от рациона организм жвачных затрачивает на образование метана до 15% энергии, лошади — до 5%, свиньи — до 2% и птица до 0,3% [1,2,3]. Разработка способов регуляции и снижения выработки метана жвачными животными не только существенно смягчит негативный экологический эффект от парниковых газов, но и снизит потери энергии, поступающей с пищей.

Для воздействия на процесс метаногенеза в организме жвачных было предложено множество способов, связанных прежде всего с алиментарными и генетическими факторами [4-6]. В ранее опубликованных обзорах были описаны алиментарные способы снижения выделения метана из организма жвачных [7,8]. Для устойчивого внедрения стратегий регулирования метаногенеза в организме животных необходимы эффективные способы, которые не будут негативно отражаться на поедаемости кормов, ферментативных процессах в рубце, переваримости питательных веществ кормов рационов [9].

Добавление жиров в рацион традиционно используется для повышения энергетической ценности рациона высокопродуктивных жвачных животных. Использование кормовых жиров в целях снижения метаногенеза в организме жвачных изучалось на протяжении десятилетий [10-13]. Использование жиров с этой целью началось после того, как было установлено влияние их на микробное сообщество рубца в связи с конкуренцией за водород, который используется в образовании метана или пропионата [14].

На сегодняшний день использование различных жиров в кормлении жвачных животных для снижения эмиссии парниковых газов является устойчивой стратегией [15-17]. Это связано с тем, что в отличие от химических соединений жиры имеют естественное происхождение, являются источником энергии и влияют на жирнокислотный профиль мяса и молока, способствуют усилению вкусовых качеств корма.

Целью настоящего обзора является обобщение современных данных о влиянии алиментарных факторов липидного питания на образование метана у жвачных.

В обзоре представлены современные данные российских и зарубежных авторов, поиск доступной литературы осуществлялся в базах данных Science Direct, Scopus, Pub MED, Google Scholar, Google Академия, Elibrary.

Механизм влияния жиров на метанообразование. Можно рассмотреть несколько путей подавления метаногенеза в организме жвачных животных за счет жировых добавок:

1. Влияние на микроорганизмы рубца посредством различных механизмов, в том числе проявление токсичности в отношении некоторых метаногенов и простейших [18]. Одним из механизмов влияния может быть следующий: жирные кислоты могут повредить мембраны клеток архей, целостность которых играет важную роль в поддержании хемиосмотического баланса, необходимого для жизнеспособности клеток и метаболизма. Нарушения структуры клеточной мембраны вызывают утечку калия, транспорт электронов и ионов, и другие реакции, которые приводят к деградации метаногена и ингибированию образования метана [19,20].

2. Снижение переваримости кормов рационов [21]. Одним из механизмов воздействия включения жиров в рационы животных является снижение усвояемости питательных веществ кормов рационов за счет обволакивания частиц корма, что повышает скорость их прохождения через желудочно-кишечный тракт и, соответственно, снижению их распада.

3. Конкуренция за водород за счет потребности ненасыщенных жирных кислот в водороде для гидрогенизации [22]. Мнения исследователей по данному вопросу расходятся. Некоторые авторы считают, что наибольшее снижение происходит из-за ненасыщенных жирных кислот, которые действуют как поглотители водорода посредством дегидрирования [23], хотя в других исследованиях сообщалось, что при гидрогенизации затрачивается только 1% водорода в рубце [24,25].

Эффективность использования жиров с целью смягчения последствий выбросов метана определяется источником [26], дозировкой [27,28], степенью насыщения [29], длиной углеродных цепей жирных кислот [30,31], структурой рациона [32], составом питательных веществ и жирных кислот основного рациона [33,34].

Рассмотрим влияние некоторых факторов на метанообразование в организме с помощью разных источников жира в экспериментах *in vivo* и *in vitro*.

Влияние длины цепи, источника жира, дозировки включения. Некоторые авторы считают, что насыщенные жирные кислоты расщепляются в рубце в минимальных количествах, однако это зависит от типа рациона и определенных условий в рубце. Еще в 1966 году исследователи впервые отмечали влияние средне-(C6-C12) и длинноцепочечных (C 18 и более атомов углерода) жирных кислот на метанообразования в рубце [35]. Тем не менее, последующие исследования ученых были сосредоточены на длинноцепочечных жирных кислотах, поскольку их влияние на метаногенез было более выражено из-за конкуренции с метаногенами за водород [36]. Однако, использование таких жирных кислот может негативно повлиять на переваримости клетчатки [37].

Авторы отмечали, что жирные кислоты со средней длиной цепи обладают определенной токсичностью по отношению к целлюлозолитическим микроорганизмам, что способствует ферментации пропионата в рубце и ингибирует выбросы метана [38].

Grainger и Beauchemin [39] также сообщили, что добавление жира часто снижает ферментацию углеводов из-за токсического воздействия жира на целлюлозолитические бактерии и простейшие, в то время как ферментация крахмала остается неизменной. Это складывается из того факта, что метаногены имеют симбиотические отношения с простейшими [40.].

Сделан вывод об эффективности использования жирных кислот C12 и C 14 даже в дозировке 3 % от рациона на снижение метаногенеза до 50 % в экспериментах *in vivo* [41].

Проведенный авторами метаанализ позволил установить, что увеличение концентрации жирных кислот со средней длиной цепи вызывало снижение выделения метана в исследованиях *in vitro* и *in vivo*, что было связано с уменьшением популяций простейших и архей, но не бактерий [42]. Среди источников жирных кислот со средней длиной цепи отмечено подавление выделения метана в следующем порядке: кокосовое масло > лауриновая кислота > миристиновая кислота > смесь лауриновой и миристиновой кислот > пальмоядровое масло > масло канолы, обогащенное лауриновыми кислотами. Более высокие концентрации рассматриваемых кислот в рационах жвачных животных приводили к снижению количества продуктов ферментации в рубце и усвояемости питательных веществ кормов. Эффективная дозировка для снижения продукции метана этих кислот составляет 40 г/кг СВ.

Использование в рационах жвачных ненасыщенных жиров является не только способом снижения выработки метана, но и может улучшить состав мононенасыщенных (МНЖК) и полиненасыщенных жирных кислот (ПНЖК) молока [43] с потенциальной пользой для здоровья человека [44]. Опыты на овцах показали, что ненасыщенные жирные кислоты группы С18 подавляют метанообразование в рубце и чем больше двойных связей в цепи высокомолекулярной кислоты, тем сильнее выражено ее ингибирующее действие [20]. Ненасыщенные жирные кислоты могут конкурировать с метаногенами за водород, тем самым подавляя выбросы метана [38].

По заключению других исследователей, включение рапсового масла, являющегося источником ненасыщенных жирных кислот, в рацион жвачных является еще одним вариантом для эффективного снижения выбросов метана у молочных коров [45,46]. Добавление в рацион молочных коров 5% рапсового масла снижает выделение метана на 23%. Негативным фактором при этом являлось снижение потребления сухого вещества (СВ) и других питательных веществ рациона [45]. В других исследованиях использование рапсового масла в дозировке 41 г/кг СВ в рационах не только снижало ежедневные выделения метана на 22,5 %, но и увеличивало относительное количество *Methanospaera* и *Succinivibrionaceae* в рубце, одновременно снижая численность бифидобактерий [46].

Проведено сравнительное изучение влияния различных жирных кислот (ЖК) на процессы пищеварения и метанообразования в организме жвачных. Так, в эксперименте на коровах голштино-фризской породы, которые выпасались на пастбище, скармливалось дополнительно 4 кг концентратов, содержащих либо стеариновую кислоту (насыщенная), льняное масло (источник ненасыщенных ЖК) или соевое масло (источник ненасыщенных ЖК). Коровы, получавшие льняное масло и соевое масло имели более низкое потребление СВ на пастбищах, чем коровы, которые получали стеариновую кислоту (11,3, 11,5 против 12,6 кг/день), имея при этом более высокие надои молока (21,0, 21,3 против 19,7 кг/день) и выход молочного белка (0,74, 0,73 против 0,67 кг/день). Выбросы метана (245 против 293, 289 г/сут, 12,4 против 15,7, 14,8 г/кг молока и 165 против 207, 195 г/кг сухого вещества молока) были ниже у коров, получавших льняное масло, чем у коров, которым предлагали другие источники липидов. Численность *Methanobrevibacter ruminantium* была снижена у коров, получавших льняное масло, по сравнению со стеариновой кислотой [32].

В другом эксперименте *in vitro* авторы сравнивали включение в рационы овец растительных масел (рапсового, кукурузного, сафлорового и подсолнечного) или глицерина в различных концентрациях (0, 20 и 40 г/кг сухого вещества, СВ) на образование метана. Включение кукурузного масла в концентрации 40 г/кг СВ показало самые низкие значения выработки метана (7,15 мл/г сухого вещества по сравнению с контролем) [47].

Не только источник липидов, но и их дозировки влияют на образование метана. Исследования других авторов показали, что добавление от 2 до 6% липидов в рацион жвачных животных может привести к снижению выбросов метана в диапазоне от 7,2% до

21,4% [27, 28, 48]. Кормление высокой концентрацией липидов (>6% СВ) может снизить усвояемость корма и клетчатки, потенциально увеличивая выведение органических и других питательных веществ, а также выбросы метана в процессе хранения навоза [49]. Кроме того, было показано, что добавление липидов снижает усвояемость клетчатки и СВ, ингибирует ферментацию в рубце, снижает синтез молочного жира и изменяет состав ЖК в животноводческой продукции [50].

Добавление в рацион источников длинноцепочечных жирных кислот в виде обработанных семян масличных культур может быть также эффективным средством сокращения выбросов метана [51]. Добавление масел имело тенденцию к снижению потребления корма (с 4% до 7%) и снижению переваримости клетчатки (с 8% до 11%). Подобно масличным культурам, масличные семена не влияли на надои молока, но ухудшали рост молодняка животных (с 13% до 20%). Поэтому включение в рацион масел и масличных культур может быть рекомендовано скорее лактирующим животным, чем растущим.

Кроме источника жира и дозировки, эффективность воздействия на метаногенез определяется и длительностью скармливания. При скармливании бычкам различных уровней диетического жира (48, 74, и 99 г/кг СВ) в концентратных смесях способствовало увеличению доли пропионата и снижению доли бутирата и ацетата и линейное снижение выдыхаемого метана [52].

Авторы проанализировали большой объем выборки ($n = 292$) из 75 статей и составили уравнение, описывающее выделение метана из организма коров с уровнем жира в рационах, которое представляет собой квадратичную зависимость: $\text{метан} = 388,91 + (31,40 \times \text{жир}) - (5,42 \times \text{жир}^2)$ [53]. Эти авторы отмечали, что при превышении ежедневного уровня жира в рационе 2,89% (экстремальная точка), наблюдалось очевидное снижение выбросов метана из организма.

Таким образом, эффективность воздействия жирных кислот на метаногенез зависит от насыщенности, длины цепи кислоты, дозировки ее включения в рацион, продолжительности скармливания. Предпочтительнее с целью снижения метаногенеза использование среднецепочечных ненасыщенных жирных кислот, поскольку эффект достигается за счет воздействия на популяцию простейших и архей, не влияя на бактерии рубца. При этом использование некоторых ненасыщенных жирных кислот в рационе жвачных негативно отражается на потреблении питательных веществ кормов. Оптимальной дозировкой включения жиров является 2-6% от СВ рациона.

Влияние состава и качества рациона и комплексное использование жиров с другими алиментарными факторами. Эффективность использования различных источников липидов на метанообразование в организме зависит от состава рациона. Так, добавление в рационы жиров оказывает больший ингибирующий эффект на выбросы метана на высоко концентратных рационах, чем при рационах на основе грубых кормов, что ограничивает применение данной стратегии при пастбищном содержании животных [54] и открывает перспективу использования данных компонентов в молочном скотоводстве [41].

В других исследованиях показано, что уровень и качество структурных углеводов влияет на эффективность применения жиров для снижения метаногенеза. Так, включение в рационы лактирующих джерсейских коров свиного сала в количестве 2% и гемицеллюлозы 11,3 или 12,7% от СВ рациона отдельно и совместно не оказало отрицательного влияния на потребление питательных веществ животными. Включение жира приводило к снижению выработки метана на кг потребляемого СВ с 24,9 до 23,1 л / кг, в то время как добавление к жиру гемицеллюлозы не оказывало подобного эффекта [28].

В исследовании, направленном на оценку влияния в рационе молочных коров уровня крахмала со смесью ненасыщенных жирных кислот или без нее (подсолнечный и рыбий жир) на выделение метана из организма установлено, что повышение уровня крахмала вместо

клетчатки не способствует снижению выработки метана, а добавки с маслом одинаково эффективны для снижения метана в рационах с низким и высоким содержанием крахмала [55].

В ряде экспериментов показано комплексное использование жиров с другими компонентами рациона с целью влияния на метаногенез. При скармливании датским голштинским коровам добавки дробленого рапса (33 и 64 г на 1 кг СВ рациона) отдельно и в сочетании с 3-нитрооскипропанолом (80 мг/кг СВ рациона) показало, что совместное скармливание добавок способствовало снижению образования метана в организме, тогда как добавка жира на это не повлияла [56]. Подобные результаты были получены при совместном применении в рационах молочных коров пищевых жиров, нитратов и 3-нитрооксипропанола [57].

В следующем исследовании авторы решили проверить эффективность способа снижения метаногенеза в организме коров при совместном использовании в рационах источников жиров и танинов. В эксперименте на коровах голштино-фризской породы с фистулами рубца установлено снижение метанообразования на 14% при даче животным 800 г в день хлопкового масла, на 11 % – при добавлении 400 г танина, и на 20% – при совместном использовании добавок, которые задавались через рубец. Авторы предполагают, что жир и танины вызывают снижение ферментации в целом, а не изменение типа ферментации [58].

Таким, образом, состав и качество рациона зависит от влияния алиментарных жиров на метанообразование в организме жвачных животных. Показано наиболее эффективное их использование на высоко концентратных типах рационов, что требует дальнейшего изучения.

Использование жиров насекомых для снижения метаногенеза. В последнее время возрос интерес к продуктам, получаемым от насекомых, что связано с интенсивным развитием в мире технологий получения кормовых средств и биологически активных добавок из данного сырья. Различные продукты из насекомых находят широкое применение в питании животных, поскольку являются источником протеина, жира и биологически активных веществ, обладающих адаптогенными, антиоксидантными, иммунными и другими свойствами [59-61].

Компонентом, которого преимущественно много у насекомых, является жир, состав которого зависит от субстрата, на котором они выращиваются [62,63]. Показано, что личинки черной львинки могут являться основным источником насыщенных жирных кислот и частично мононенасыщенных и полиненасыщенных жирных кислот в качестве замены рыбьего жира [64]. Другие авторы показали, что в составе жирных кислот этих насекомых 59% лауриновой кислоты [60].

Насекомые использовались в качестве кормового ингредиента для ряда видов животных, таких как цыплята-бройлеры [65,66], свиньи [67,68] и аквакультуры [69]. Однако их использование в кормлении жвачных животных ограничено [70-73]. Немногочисленны и исследования использования в питании жвачных и липидных фракций насекомых [59-61]. Кроме этого, данных о биологическом влиянии жира насекомых на процессы пищеварения и метаногенез еще немного, и они в основном проведены *in vitro*. Данное направление развивается и мы в обзоре приводим данные, которые имеются по данному вопросу в настоящее время.

В работе A. Jayanegara et al. [74] личинки, суперчерви, мучные черви и сверчки, подвергались масляной экстракции с использованием гексана в аппарате Сокслета, был также определен жирнокислотный состав полученных масел. Масла насекомых добавлялись в количестве 5% от СВ рационов с высоким содержанием грубых кормов (70% корма + 30% концентратов) и с высоким содержанием концентратов (30% корма + 70%

концентратов). Установлено, что масла насекомых богаты среднецепочечными МНЖК и обладают способностью снижать выбросы метана. Добавление масла насекомых снижало выделение метана инкубируемых субстратов без изменения общей концентрации летучих жирных кислот (ЛЖК), при этом масло мучных червей приводило к самому низкому уровню метана среди масел насекомых. Масла не оказали существенного влияния на концентрацию аммиака в рубце и снизили усвояемость сухих и органических веществ субстратов. Добавление масла черной львинки в концентрации 4% с соотношением грубых кормов к концентратам 40:60 увеличило уровень пропионовой кислоты, снизило образование метана и сохранило способность к перевариванию СВ. Включение 6% масла при различных соотношениях грубых кормов к концентратам снижало усвояемость СВ, ОБ *in vitro*, образование аммонийного азота и популяцию простейших [75].

Другие исследователи также наблюдали снижение уровня аммиака и выделения метана в эксперименте *in vitro* при инкубации полножирных кормов из личинок насекомых [76], объясняя это высоким содержанием полиненасыщенных ЖК.

В других исследованиях было показано, что эффективность использования масла личинки *Hermetia illucens* для снижения метаногенеза в рубце зависит от дозировки включения в рацион [77]. Масло личинки в эксперименте *in vitro* в дозировках 4% и 5% снижало выбросы метана на 20,7; и 26,9%, снижение дозировки до 3% не оказало влияние на метанообразование. Усвояемость органического вещества (ОВ) линейно снижалась с увеличением дозировки масла личинки без изменения концентрации ЛЖК.

G. Thirumalaisamy et al. [78] проведено изучение длительного (в течение 180 дней) скармливания овцам масла куколок тутового шелкопряда в дозировке 2% от СВ рациона с двумя различными режимами приема добавок (ежедневно и раз в две недели) на ежедневную эмиссию метана, выход метана, усвояемость питательных веществ, ферментацию в рубце, состав сообщества рубцовых архей и популяция простейших. Основной рацион животных состоял из соломы пальчатого проса и концентрата в соотношении 55:45. Наблюдали снижение метанообразования в группах овец, получавших добавку ежедневно и раз в две недели на 23-25%. Авторы отмечали временный характер антиметаногенного эффекта масла. Добавление масла снижало общее количество простейших ($\times 10^7$ клеток/мл), энтодиниоморф ($\times 10^7$ клеток/мл) и голотрихов ($\times 10^6$ клеток/мл), а непрерывный прием добавок привел к наибольшему снижению выбросов кишечного метана у овец [78].

Закключение. Таким образом, использование жира в рационах жвачных животных является эффективным способом снижения выделения метана в рубце, но существуют и негативные аспекты этого использования. Например, чрезмерное использование жиров способствует снижению потребления кормов, переваримости клетчатки [79]. С другой стороны, преимущество липидных добавок заключается в том, что они легко доступны и их легко применять в различных системах кормления животных. Добавление жиров в рацион не представляет риска для безопасности животных или человека, они широко доступны, имеют естественное происхождение, в отличие от химических соединений, являются источником энергии, положительно влияют на жирнокислотный профиль мяса и молока, способствуют усилению вкусовых качеств корма. Кроме этого, ингибирующее действие липидов на выбросы метана не является временным, а сохраняется с течением времени [80].

Таким образом, основываясь на обзоре, можно сделать вывод, что масла и липиды могут эффективно использоваться отдельно или в сочетании с другими стратегиями для снижения выбросов метана в организме жвачных животных.

Несмотря на достаточное количество информации по вопросу использования липидов в качестве воздействия на метаногенез в доступной литературе, есть ряд вопросов, которые требуют дополнительных исследований. Например, до сих пор остается

неизученной роль липидов в процессе метанообразования в организме жвачных при различном составе рационов. Актуален поиск новых отечественных источников жирных кислот со средней длиной цепи для использования в целях сокращения потерь энергии с метаном. Недостаточно информации о влиянии жира насекомых в экспериментах *in vivo*. Интерес представляет сравнение биологического эффекта источников жира разного происхождения (растительного и животного), содержащих различный набор жирных кислот, на процессы образования метана в рубце жвачных животных. Необходимо более глубокое изучение механизмов, в том числе молекулярно-генетических, воздействия стратегий на основе алиментраных липидов по смягчению метанообразования на продуктивность, здоровье животных. Актуальным направлением является разработка отечественных моделей для оценки выделения метана и жирнокислотного состава рациона.

Литература.

1. Гриднева, Т. Т. Эмиссия вредных газов при производстве животноводческой продукции / Т.Т. Гриднева // Вестник ВНИИМЖ. - 2012.- № 4(8). С. 61–69.
2. Hristov, A.N. Special topics—Mitigation of methane and nitrous oxide emissions from animal operations: I. A review of enteric methane mitigation options / A.N. Hristov, J. Oh, J. Firkins, J. Dijkstra, E. Kebreab, G. Waghorn, H. Makkar, A. Adesogan, W. Yang, C. Lee // J. Anim. Sci.- 2013. – V. 9. –P. 5045–5069. doi: 10.2527/jas.2013-6583.
3. Ellis, J.L. Prediction of methane production from dairy and beef cattle / J.L. Ellis, E. Kebreab, N.E. Odongo, B.W. McBride, E.K. Okine // J Dairy Sci.- 2007.- V.90.- P. 3456–3466. doi: 10.3168/jds.2006-675.
4. Knapp, J.R. Enteric methane in dairy cattle production: Quantifying the opportunities and impact of reducing emissions / J. R. Knapp, G.L. Laur, P.A. Vadas, W.P. Weiss, J.M. Tricarico // Journal of Dairy Science. – 2014. – V.97.- P.3231–3261. doi: 10.3168/jds.2013-7234.
5. Patra, A. K. Recent advances in measurement and dietary mitigation of enteric methane emissions in ruminants / A.K. Patra // Frontiers in Veterinary Science. - 2016.-V.3.- P.1–17. doi: 10.3389/fvets.2016.00039.
6. Palangi, V. Management of enteric methane emissions in ruminants using feed additives: A review / V. Palangi, M. Lackner // Animals.-2022.-V.12(24).- 3452. doi: 10.3390/ani12243452.
7. Боголюбова, Н.В. Метанообразование в рубце и методы его снижения с использованием алиментарных факторов (обзор) / Н. В. Боголюбова, А. А. Зеленченкова, Н. С. Колесник, П. Д. Лахонин // Сельскохозяйственная биология. – 2022. – Т. 57, № 6. – С. 1025-1054. – doi:10.15389/agrobiology.2022.6.1025rus.
8. Колесник, Н. С. Влияние различных классов танинов на метаногенез у жвачных животных (обзор) / Н. С. Колесник, Н. В. Боголюбова, А. А. Зеленченкова // Сельскохозяйственная биология. – 2024. – Т. 59, № 2. – С. 221-236. doi: 10.15389/agrobiology.2024.2.221rus.
9. Patra, A. K. Rumen methanogens and mitigation of methane emission by anti-methanogenic compounds and substances / A. K. Patra, T Park, M. Kim, Z. Yu // Journal of Animal Science and Biotechnology. – 2017. – V.8.- P. 1–18. doi:10.1186/s40104-017-0145-9.
10. Blaxter, K. L. Modification of the methane production of the sheep by supplementation of ITS diet / K.L. Blaxter, J.Czerkawski // Journal of the Science of Food and Agriculture. -1966.-V.17.- P.417–421. doi: 10.1002/jsfa.2740170907.
11. Patra, A. K. A meta-analysis of the effect of dietary fat on enteric methane production, digestibility and rumen fermentation in sheep, and a comparison of these responses between cattle and sheep /Patra A. K.//. Livestock Science. – 2014. – V.162.- P. 97–103. doi: 10.1016/j.livsci.2014.01.007.
12. Toprak, N.N. Do fats reduce methane emission by ruminants?-A review / N.N. Toprak .- 2015.- P.305-321.
13. Szczechowiak, J. Blood hormones, metabolic parameters and fatty acid proportion in dairy cows fed condensed tannins and oils blend / J.Szczechowiak, K.Szkudelska, M. Szumacher-Strabel, S. Sadkowski, K. Gwozdz, M.El-Sherbiny, K M.ozłowska, V. Rodriguez, A. Cieslak // Annals of Animal Science. – 2018. – V.18.- P.155–166. doi: 10.1515/aoas-2017-0039.
14. Fonty, G.Ruminal methanogenesis and its alternatives / G. Fonty, B.Morvan // Annales de Zootechnie. – 1996. – V. 4.- P.313-318.

15. Patra, A. Rumen methanogens and mitigation of methane emission by anti-methanogenic compounds and substances / A. Patra, T. Park, M. Kim, Z. Yu // *J. Anim. Sci. Biotechnol.* - 2017.- V. 8.- 13. doi: 10.1186/s40104-017-0145-9.
16. Rabiee, A.R. Effect of fat additions to diets of dairy cattle on milk production and components: A meta-analysis and metaregression / A.R. Rabiee, K., Breinhild, W. Scott, H.M. Golder, E. Block, U.J. Lean // *J. Dairy Sci.* - 2012.- V. 9.- P.3225–3247.
17. Kliem, K. Differential effects of oilseed supplements on methane production and milk fatty acid concentrations in dairy cows / K. Kliem, D. Humphries, P. Kirton, D. Givens, C. Reynolds // *Animal.* - 2019.- V.1.- P. 309–317.
18. Machmüller, A. Methane-suppressing effect of myristic acid in sheep as affected by dietary calcium and forage proportion / A. Machmüller, C.R. Soliva, M. Kreuzer // *Br. J. Nutr.* - 2003. – V. 90. – P. 529–540.
19. Patra, A.K. Enteric methane mitigation technologies for ruminant livestock: A synthesis of current research and future directions / A. K. Patra // *Environ. Monit. Assess.* - 2012.- V.184.- P. 1929–1952.
20. Алиев, А.А. Липидный обмен и продуктивность жвачных животных / А. А. Алиев. - Москва: Колос, 1980. - 381 с.
21. Wang, S. Contribution of ruminal fungi, archaea, protozoa, and bacteria to the methane suppression caused by oilseed supplemented diets / S. Wang, K. Giller, M. Kreuzer, S.E. Ulbrich, U. Braun, A. Schwarm // *Front. Microbiol.* - 2017. –V. 8.- 1864.
22. Johnson, K.A. Methane emissions from cattle / K.A. Johnson, D.E. Johnson // *J Anim Sci.* – 1995.- V.73. –P. 2483–2492.
23. Boadi, D. Mitigation strategies to reduce enteric methane emissions from dairy cows: update review / D. Boadi, C. Benchaar, J. Chiquette, D. Masse // *Can J Anim Sci.* - 2004.- V.84.- P.319–335.
24. Giger-Reverdin, S. Literature survey of the influence of dietary fat composition on methane production in dairy cattle / S., Giger-Reverdin, P. Morand-Fehr, G. Tran // *Livest Prod Sci.* - 2003.- V. 82.- P.73–79.
25. Jenkins, T.C. Board-invited review: Recent advances in biohydrogenation of unsaturated fatty acids within the rumen microbial ecosystem / T.C. Jenkins, R.J. Wallace, P.J. Moate, E.E. Mosley // *J. Anim. Sci.* - 2008.- V. 86.- P.397–412.
26. Yanza, Y. R. The effects of dietary medium-chain fatty acids on ruminal methanogenesis and fermentation in vitro and in vivo: A meta-analysis / Y.R. Yanza, M. Szumacher-Strabel, A. Jayanegara, A.M. Kasenta, M. Gao, H. Huang, A.K. Patra, E. Warzycharzyc, A. Cieślak // *Journal of animal physiology and animal nutrition.* – 2021. – V.105(5).- P.874-889. doi:10.1111/jpn.13367.
27. Beck, M. Fat supplements differing in physical form improve performance but divergently influence methane emissions of grazing beef cattle/ M. Beck, L. Thompson, G. Williams, S. Place, S. Gunter, R. Reuter // *Anim. Feed Sci. Technol.* - 2019.- V. 254.- P.114210.
28. Drehmél, O. The influence of fat and hemicellulose on methane production and energy utilization in lactating Jersey cattle / O. Drehmél, T. Brown-Brandl, J. Judy, S.C. Fernando, P.S. Miller, K. Hales, P.J. Kononoff // *J. Dairy Sci.* - 2018.- V. 101.- P.7892–7906.
29. Amanullah, S. M. Effects of essential fatty acid supplementation on in vitro fermentation indices, greenhouse gas, microbes, and fatty acid profiles in the rumen / S. M. Amanullah, D. H. Kim, D. H. V. Paradhita, L.H. Jee, Y.H. Joo, S.S. Lee, E.T. Kim, S. C. Kim // *Frontiers in Microbiology.* – 2021. – V.12, 637220. doi:10.3389/fmicb.2021.637220.
30. Vadroňová, M. Combined effects of nitrate and medium-chain fatty acids on methane production, rumen fermentation, and rumen bacterial populations in vitro / M. Vadroňová, A. Šťovíček, K. Jochová, A. Výborná, Y. Tyrolová, D. Tichá, P. Homolka, M. Joch // *Scientific Reports.* – 2023. - V.13(1), 21961.
31. Luan, J. Effects of medium-chain fatty acids (MCFAs) on in vitro rumen fermentation, methane production, and nutrient digestibility under low-and high-concentrate diets / J. Luan, X. Feng, D. Yang, M. Yang, J. Zhou, C. Geng // *Animal Science Journal.* – 2023.- V.94(1), e13818. doi:10.1111/asj.13818.
32. Boland, T. M. Feed intake, methane emissions, milk production and rumen methanogen populations of grazing dairy cows supplemented with various C 18 fatty acid sources / T. M. Boland, K. M. Pierce, A. K. Kelly, D. A. Kenny, M. B. Lynch, S. M. Waters, S.J. Whelan, Z.C. McKay // *Animals.* - 2020- V.10(12).-2380. doi:10.3390/ani10122380.

33. Patra, A.K. The effect of dietary fats on methane emissions, and its other effects on digestibility, rumen fermentation and lactation performance in cattle: A meta-analysis / A.K. Patra // *Livest. Sci.*- 2013.- V.155.- P. 244–254. doi: 10.1016/j.livsci.2013.05.023.
34. Króliczewska, B. Strategies used to reduce methane emissions from ruminants: controversies and issues / B. Króliczewska, E.Pecka-Kiełb, J.Bujok // *Agriculture.*- 2023.- V. 13(3).- P.602. doi:10.3390/agriculture13030602.
35. Blaxter, K.L.Modifications of the methane production of the sheep by supplementation of its diet / K.L. Blaxter,, J. Czerkowski // *J. Sci. Food Agric.*- 1966.-V.17.- P. 417–421. doi:10.1002/jsfa.2740170907.
36. Van Nevel, C.J. Control of rumen methanogenesis / C.J. Van Nevel, D.I. Demeyer // *Environ. Monit. Assess.*- 1996.-V. 42. –P.73–97.
37. Broudiscou, L. Effect of soya oil hydrolysate on rumen digestion in defaunated and refaunated sheep / L. Broudiscou, C.J.Van Nevel, D.I. Demeyer // *Anim. Feed Sci. Technol.*- 1990.- V. 30.- P.51–67. doi:10.1016/0377-8401(90)90051-9.
38. Min, B.R. Dietary mitigation of enteric methane emissions from ruminants: a review of plant tannin mitigation options / B.R. Min, S. Solaiman, H.M. Waldrip, D. Parker, R.W. Todd, D. Brauer // *Anim Nutr.* – 2020.- V.6.- P. 231-246. doi: 10.1016/j.aninu.2020.05.002.
39. Grainger, C. Can enteric methane emissions from ruminants be lowered without lowering their production? / C. Grainger, K.A. Beauchemin // *Anim Feed Sci Technol.*-2011.- V. 166-167.- P.308–320 doi:10.1016/j.anifeedsci.2011.04.021.
40. Finlay, B.J. Some rumen ciliates have endosymbiotic methanogens / B.J. Finlay, G.Esteban, K.J. Clarke, A.G. Williams, T.M. Embley, R.P. Hirt // *FEMS Microbiology Letters.* -1994.- V. 117(2).- P.157-162. doi:10.1111/j.1574-6968.1994.tb06758.x.
41. Machmüller, A. Medium-chain fatty acids and their potential to reduce methanogenesis in domestic ruminants / A. Machmüller, *Agriculture, Ecosystems & Environment.* – 2006. – V. 112(2-3).- P. 107–114. doi:10.1016/j.agee.2005.08.010.
42. Yanza, Y. R. The effects of dietary medium-chain fatty acids on ruminal methanogenesis and fermentation in vitro and in vivo: A meta-analysis / Y. R. Yanza, M. Szumacher-Strabel, A. Jayanegara, A.M. Kasenta, M. Gao, H. Huang, A.K.Patra, A.Cieślak // *Journal of animal physiology and animal nutrition.*- 2021.- V. 105(5). –P. 874-889. doi:10.1111/jpn.13367.
43. Bayat, A.R. Plant oil supplements reduce methane emissions and improve milk fatty acid composition in dairy cows fed grass silage-based diets without affecting milk yield / A.R. Bayat, I. Tapio, J. Vilkkki, K. Shingfield, H.Leskinen // *J. Dairy Sci.*- 2018.- V. 101.-P. 1136–1151. doi:10.3168/jds.2017-13545.
44. Lanier, J.S. Challenges in enriching milk fat with polyunsaturated fatty acids / J.S. Lanier, B.A. Corl // *J. Anim. Sci. Biotechnol.*- 2015. –V. 6.-P. 26.
45. Ramin, M. Enteric and Fecal Methane Emissions from Dairy Cows Fed Grass or Corn Silage Diets Supplemented with Rapeseed Oil / M.Ramin, J.C. Chagas, H. Smidt, R.G. Exposito, S.J. Krizsan // *Animals.*- 2021.-V.11.- 1322. doi:10.3390/ani11051322.
46. Chagas, J.C. Effect of a Low-Methane Diet on Performance and Microbiome in Lactating Dairy Cows Accounting for Individual Pre-Trial Methane Emissions / J.C. Chagas, M.Ramin, R.G.Exposito, H. Smidt, S.J. Krizsan // *Animals.*- 2021.- V.11(9).- 2597. doi:10.3390/ani11092597.
47. Castañeda-Rodríguez, C. S. Effect of Vegetable Oils or Glycerol on the In Vitro Ruminal Production of Greenhouse Gases / C.S.Castañeda-Rodríguez, G. A. Pámanes-Carrasco, J. B. Páez-Lerma, E. Herrera-Torres, E.E. Araiza-Rosales, V. Hernández-Vargas, H.M. Roldán, D. Reyes-Jáquez // *Ruminants.* – 2023.-V.3(2).- P.140-148. doi:10.3390/ruminants3020013.
48. Beauchemin, K.A. Fifty years of research on rumen methanogenesis: lessons learned and future challenges for mitigation / K.A. Beauchemin, E.M. Ungerfeld, R.J. Eckard, M. Wang// *Animal.*- 2020.- V. 14(S1).- P. 2–16. doi: 10.1017/S1751731119003100.
49. Hassanat, F. Methane emissions of manure from dairy cows fed red clover- or corn silage-based diets supplemented with linseed oil / F. Hassanat, C. Benchaar, . J. Dairy Sci.- 2019.- V.102.- P. 11766–11776. doi:10.3168/jds.2018-16014.
50. Grainger, C. Can enteric methane emissions from ruminants be lowered without lowering their production?/ C. Grainger, K.A. Beauchemin // *Anim. Feed Sci. Technol.*- 2011.-V.166–167.- P. 308–320. doi:10.1016/j.anifeedsci.2011.04.021.
51. Beauchemin, K.A. Crushed Sunflower, Flax, or Canola Seeds in Lactating Dairy Cow Diets: Effects on Methane Production, Rumen Fermentation, and Milk Production / K.A. Beauchemin,

- S.M. McGinn, C. Benchaar, L. Holtshausen // *Journal of Dairy Science*. - 2009. - V.92. - P.2118-2127. doi: 10.3168/jds.2008-1903.
52. Cho, H. Effects of Dietary Fat Level of Concentrate Mix on Growth Performance, Rumen Characteristics, Digestibility, Blood Metabolites, and Methane Emission in Growing Hanwoo Steers / H. Cho, S. Jeong, K. Kang, M. Lee, S. Jeon, H. Kang, H. Kim, S. Seo, J. Oh // *Animals*. - 2023. - V.14(1). - 139. doi: 10.3390/ani14010139.
53. Zhang, C. Dietary fat and carbohydrate-balancing the lactation performance and methane emissions in the dairy cow industry: A meta-analysis / C. Zhang, X. Jiang, S. Wu, J. Zhang, Y. Wang, Z. Li, J. Yao // *Animal Nutrition*. - 2024. - V. 17. - P. 347-357. doi:10.1016/j.aninu.2024.02.004.
54. Beauchemin, K.A. Invited review: Current enteric methane mitigation options / K.A. Beauchemin, E.M. Ungerfeld, A.L. Abdalla, C. Alvarez, C. Arndt, P. Becquet, C. Benchaar, A. Berndt, R.M. Mauricio, T.A. McAllister, W. Oyhantçabal, S.A. Salami, L. Shalloo, Y. Sun, J. Tricarico, A. Uwizye, C. De Camillis, M. Bernoux, T. Robinson, E. Kebreab // *J. Dairy Sci.* - 2022. - V.105. - P. 9297-9326. doi:10.3168/jds.2022-22091.
55. Darabighane, B. Effects of starch level and a mixture of sunflower and fish oils on nutrient intake and digestibility, rumen fermentation, and ruminal methane emissions in dairy cows / B. Darabighane, I. Tapio, L. Ventto, P. Kairenius, T. Stefański, H. Leskinen, K.J. Shingfield, J. Vilkki, A.R. Bayat // *Animals*. - 2021. - V.11(5). - 1310. doi:10.3390/ani11051310.
56. Kjeldsen, M. H. Gas exchange, rumen hydrogen sinks, and nutrient digestibility and metabolism in lactating dairy cows fed 3-nitrooxypropanol and cracked rapeseed / M.H. Kjeldsen, M.R. Weisbjerg, M. Larsen, O. Højberg, C. Ohlsson, N. Walker, A.L.F. Hellwing, P. Lund // *Journal of Dairy Science*. - 2024. - V.107(4). - P.2047-2065. doi:10.3168/jds.2023-23743.
57. Maigaard, M. Effects of dietary fat, nitrate, and 3-nitrooxypropanol and their combinations on methane emission, feed intake, and milk production in dairy cows / M. Maigaard, M. R. Weisbjerg, M. Johansen, N. Walker, C. Ohlsson, P. Lund // *Journal of Dairy Science*. - 2024. - V.107(1). - P. 220-241. doi:10.3168/jds.2023-23420.
58. Williams, S. R. O. Supplementing the diet of dairy cows with fat or tannin reduces methane yield, and additively when fed in combination / S. R. O. Williams, M. C. Hannah, R.J. Eckard, W. J. Wales, P.J. Moate // *Animal*. - 2020. - V.14(S3). - P.464-472. doi:10.1017/S1751731120001032.
59. Некрасов, Р.В. Влияние липидной фракции личинок Чёрной львинки на продуктивность, резистентность и обменные процессы у телят молочного периода выращивания / Р. В. Некрасов, М. Г. Чабаев, Е. В. Туаева, Д.А. Никанова, Н.В. Боголюбова, С.О. Шаповалов, Г.А. Иванов // *Аграрная наука*. - 2023. - № 11. - С. 64-69. - doi: 10.32634/0869-8155-2023-376-11-64-69.
60. Некрасов, Р.В. Влияние скармливания жировой добавки из личинок *Hermetia illucens* на рубцовое пищеварение и молочную продуктивность коров / Р. В. Некрасов, М. Г. Чабаев, Н. В. Боголюбова, Г. А. Иванов // *Проблемы биологии продуктивных животных*. - 2023. - № 2. - С. 78-87. - doi: 10.25687/1996-6733.prodanimbiol.2023.2.78-87.
61. Nekrasov, R.V. Effect of Black Soldier Fly (*Hermetia illucens* L.) Fat on Health and Productivity Performance of Dairy Cows / R. V. Nekrasov, G. A. Ivanov, M. G. Chabaev, A.A. Zelenchenkova, N.V. Bogolyubova, D. A. Nikanova, A.A. Sermyagin, S.O. Bibikov, S.O. Shapovalov // *Animals*. - 2022. - Vol. 12, No. 16. - P. 2118. - doi: 10.3390/ani12162118.
62. Siddiqui, S. A. Manipulation of the black soldier fly larvae (*Hermetia illucens*; Diptera: Stratiomyidae) fatty acid profile through the substrate / S.A. Siddiqui, E. R. Snoeck, A. Tello, M. C. Alles, I. Fernando, Y.R. Saraswati, T. Rahayu, R. Grover, M. Ullah, B. Ristow, Nagdalian, A. A. // *Journal of Insects as Food and Feed*. - 2022. - V.8(8). - P.837-855. doi: 10.3920/JIFF2021.0162.
63. Beskin, K. V. Larval digestion of different manure types by the black soldier fly (Diptera: Stratiomyidae) impacts associated volatile emissions / K. V. Beskin, C. D. Holcomb, J. A. Cammack, T.L. Crippen, A. H. Knap, S.T. Sweet, J. K. Tomberlin // *Waste Management*. - 2018. - V.74. - P.213-220. doi: 10.1016/j.wasman.2018.01.019.
64. Li, X. Growth and fatty acid composition of black soldier fly *Hermetia illucens* (Diptera: Stratiomyidae) larvae are influenced by dietary fat sources and levels / X. Li, Y. Dong, Q. Sun, X. Tan, C. You, Y. Huang, M. Zhou // *Animals*. - 2022. - V.12(4). - 486. doi: 10.3390/ani12040486.
65. Schiavone, A. Nutritional value of a partially defatted and a highly defatted black soldier fly larvae (*Hermetia illucens* L.) meal for broiler chickens: apparent nutrient digestibility, apparent metabolizable energy and apparent ileal amino acid digestibility / A. Schiavone, M. De Marco, S.

- Martínez, S. Dabbou, M. Renna, J. Madrid, F. Hernandez, L. Rotolo, P. Costa, F. Gai, L. Gasco // *J Anim Sci Biotechnol.* - 2017.-V.8.-51.
66. Benzertiha, A. Tenebrio molitor and Zophobas morio full-fat meals in broiler chicken diets: effects on nutrients digestibility, digestive enzyme activities, and cecal microbiome / A. Benzertiha, B., Kierończyk, M. Rawski, A. Józefiak, K. Kozłowski, J. Jankowski, D. Józefiak // *Animals.* - 2019.- V. 9(12). -1128. doi:10.3390/ani9121128.
67. Biasato, I. Partially defatted black soldier fly larva meal inclusion in piglet diets: effects on the growth performance, nutrient digestibility, blood profile, gut morphology and histological features/ I. Biasato, M. Renna, F. Gai, S. Dabbou, M. Meneguz, G. Perona, S. Martinez, A.C.B. Lajusticia, S. Bergagna, L. Sardi, M.T. Capucchio, E. Bressan, A. Dama, A. Schiavone, L. Gasco // *J Anim Sci Biotechnol.* - 2019.- V.10(1).-12.
68. Nekrasov, R.V. The use of the larvae of Zophobas morio and galleria mellonella in feeding growing pigs / R. V. Nekrasov, M. G. Chabaev, E. Yu. Tsis, D. A. Nikanova, G. A. Ivanov // *Bioscience Journal.* – 2022. – Vol. 38. – P. e38054. – doi: 10.14393/bj-v38n0a2022-59572.
69. Gasco, L. Tenebrio molitor meal in diets for European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) juveniles: growth performance, whole body composition and in vivo apparent digestibility / L. Gasco, M. Henry, G. Piccolo, S. Marono, F. Gai, M. Renna, C. Lussiana, E. Antonopoulou, P. Mola, S. Chatzifotis // *Anim Feed Sci Technol.* -2016.- V.220.- P 34–45. doi: 10.1016/j.anifeedsci.2016.07.003.
70. Jayanegara, A. Evaluation of some insects as potential feed ingredients for ruminants: chemical composition, in vitro rumen fermentation and methane emissions / A. Jayanegara, N. Yantina, B., Novandri, E.B. Laconi, N. Nahrowi, M. Ridla // *J Indonesian Trop Anim Agric.* - 2017.-V.42(4).- P.247–254. doi:10.14710/jitaa.42.4.247-254.
71. Astuti, D.A. Performance, physiological status, and rumen fermentation profiles of pre- and post-weaning goat kids fed cricket meal as a protein source / D.A. Astuti, A. Anggraeny, L. Khotijah, S. Suharti, A. Jayanegara // *Trop Anim Sci J.* - 2019.- V. 42(2). –P.145–151. doi:10.5398/tasj.2019.42.2.145.
72. Hervás, G. Insect oils and chitosan in sheep feeding: Effects on in vitro ruminal biohydrogenation and fermentation / G. Hervás, Y. Boussalia, Y. Labbouz, A. Della Badia, P. G. Toral, P. Frutos // *Animal Feed Science and Technology.* - 2022.- V.285.- 115222. doi:10.1016/j.anifeedsci.2022.115222.
73. Ningsih, R. H. C. Effects of Black Soldier Fly oil and calcium soap supplementation on rumen fermentability of Garut Sheep / R. H. C. Ningsih, A. D. Ramadani, D. J. Raynissa, D. Diapari, D. M. Fassah, D. A. Astuti, A. Sudarman // *In IOP Conference Series: Earth and Environmental Science.* – 2023.- V.1208, No. 1. - 012059. doi:10.1088/1755-1315/1208/1/012059.
74. Jayanegara, A. Fatty acid profiles of some insect oils and their effects on in vitro bovine rumen fermentation and methanogenesis / A. Jayanegara, R. Gustanti, R. Ridwan, Y. Widyastuti // *Italian Journal of Animal Science.* - 2020.-V. 19(1).- P. 1310-1317. doi:10.1080/1828051X.2020.1841571.
75. Prachumchai, R., & Cherdthong, A. (2023). Black Soldier Fly Larva Oil in Diets with Roughage to Concentrate Ratios on Fermentation Characteristics, Degradability, and Methane Generation / R. Prachumchai, A. Cherdthong // *Animals.* – 2023.- V. 13(15).- 2416. doi:10.3390/ani13152416.
76. Renna, M. Full-fat insect meals in ruminant nutrition: in vitro rumen fermentation characteristics and lipid biohydrogenation / M. Renna, M. Coppa, C. Lussiana, A. Le Morvan, L. Gasco, G. Maxin // *Journal of Animal Science and Biotechnology.* - 2022.- V.13(1).- 138.
77. Jayanegara, A. Maggot oil as a feed supplement for reducing methanogenesis of rumen microbial culture in vitro / J. A. Jayanegara, D. Anzhany, D. Despal // *In IOP Conference Series: Materials Science and Engineering.* – 2021. - V. 1098, No. 4.- 042100. doi:10.1088/1757-899X/1098/4/042100.
78. Thirumalaisamy, G. Effect of long-term supplementation with silkworm pupae oil on the methane yield, ruminal protozoa, and archaea community in sheep / G. Thirumalaisamy, P.K. Malik, S. Trivedi, A.P. Kolte, R. Bhatta // *Frontiers in Microbiology.* -2022.- V. 13.- 780073. doi:10.3389/fmicb.2022.780073.
79. McGinn, S.M. Methane emissions from beef cattle: Effects of monensin, sunflower oil, enzymes, yeast, and fumaric acid / S.M. McGinn, K.A. Beauchemin, T. Coates, D. Colombatto // *J. Anim. Sci.* - 2004. –V. 82(11).- P.3346–3356. doi:10.2527/2004.82113346x.
80. Guyader, J. Dose-response effect of nitrate on hydrogen distribution between rumen fermentation end products: An in vitro approach / J. Guyader, M. Tavendale, C. Martin, S. Muetzel // *Anim. Prod. Sci.* - 2016. –V.56(3).- P. 224–230. doi:10.1071/AN15526.

№1
2025 г.

УСПЕХИ НАУК О ЖИВОТНЫХ

Сетевое научное издание

ПРАВИЛА ДЛЯ АВТОРОВ



КОНТАКТЫ

Ершова Анастасия Игоревна

Email: ernst_journal@vij.ru

Телефон: +7(4967)-65-11-44

Адрес редакции: 142132, Московская обл.,
г.о. Подольск, пос. Дубровицы, д. 60