


*На правах рукописи*

**Косовский Глеб Юрьевич**

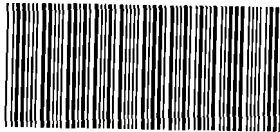


**КЛЕТОЧНЫЕ И ГЕНОМНЫЕ ТЕХНОЛОГИИ В ПОВЫШЕНИИ  
ЭФФЕКТИВНОСТИ ЖИВОТНОВОДСТВА**

**Специальность: 03.01.06 – биотехнология (в том числе бионапотехнологии)**

**АВТОРЕФЕРАТ**

**диссертации на соискание ученой степени  
доктора биологических наук**



**005545823**

13 MAR 2014

**Щелково – 2014**

Работа выполнена в Государственном научном учреждении Центр экспериментальной эмбриологии и репродуктивных биотехнологий Россельхозакадемии.

**Научный консультант:**

академик РАСХН, академик НААН Украины,  
доктор ветеринарных наук, профессор,  
лауреат Государственной премии РФ,  
Заслуженный деятель науки РФ

**Анатолий Яковлевич Самуйленко**

**Официальные оппоненты:**

**Завченкова Ирина Петровна** – доктор биологических наук, профессор, заведующая сектором стволовых клеток ГНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии им. Я.Р. Коваленко»;

**Юрков Сергей Григорьевич** - доктор биологических наук, профессор, заведующий лабораторией культур клеток ГНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт ветеринарной микробиологии и вирусологии»;

**Кочнева Марина Львовна**- доктор биологических наук, профессор кафедры ветеринарной генетики Новосибирского аграрного университета.

**Ведущая организация:** ФГБОУ ВПО «Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии им. К.И. Скрябина»

Защита состоится 4 апреля 2014 г. в 10<sup>00</sup> на заседании диссертационного совета Д 006.069.01 по защите диссертаций на соискание ученой степени доктора наук во Всероссийском научно-исследовательском и технологическом институте биологической промышленности РАСХН по адресу: 141142, Московская область, Щелковский района, пос. Биокомбината, д. 17, ВНИТИБП; e-mail: [vnitibp@mail.ru](mailto:vnitibp@mail.ru).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Всероссийского научно-исследовательского и технологического института биологической промышленности.

Автореферат разослан 26.02. 2014г. и размещен на сайте ВНИТИБП Россельхозакадемии [www.vnitibp.com](http://www.vnitibp.com) и на официальном сайте ВАК <http://www.vak.ed.gov.ru>

Ученый секретарь диссертационного совета,  
кандидат биологических наук



Ю.Д. Фролов

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность** применения геномных и клеточных технологий в целях ускорения селекционной работы, размножения и преимущественного сохранения животных с желательным проявлением фенотипических признаков, консолидации имеющихся и получения генетически трансформированных животных не вызывает сомнений на протяжении нескольких последних десятилетий (Зиновьева Н.А., Эрнст Л.К., 2006; Эрнст Л.К., Зиновьева Н.А., 2008, 2010; Самуйленко А.Я. и др., 2000, 2012; Харченко П.Н., Глазко В.И. 2006; FAO, 2007 – 2012; Pedersen L.D. et al., 2012). Однако до сих пор использование этих технологий не приобрело массового масштаба и во многих случаях не выходит за рамки экспериментальных исследований. Одной из причин такого отставания практического применения накопленных технологий, по-видимому, может являться отсутствие концепции последовательных этапов их применения в целях увеличения эффективности и сокращения времени традиционной селекционной работы. Первым этапом такой технологической цепочки должен быть комплекс методов, позволяющий отбирать и подбирать животных с повышенной вероятностью желательного проявления характеристик продуктивности и адаптивного потенциала в их потомстве. В целях прогноза продуктивности в настоящее время, в частности, в молочном скотоводстве, применяются методы «геномной селекции», когда на основании геномного сканирования по мононуклеотидным заменам (SNP) отбираются группы полилокусных генотипов, объединяющие быков с высокой молочной продуктивностью их дочерей. В дальнейшем такие комплексные генотипы используются для отбора среди молодых бычков наиболее перспективных для ускорения генетического прогресса (Weller J., Ron M., 2011; Dekkers J.C.M., 2012, Lenstra J. A. et al., 2012; Schwarzenbacher H. et al., 2012). Однако оказалось, что селекционная ценность быков, оцениваемая по молочной продуктивности их дочерей, существенно зависит от эколого-географических условий воспроизводства коров-дочерей с применением искусственного оплодотворения спермопродуктами, получаемыми от одних и тех же быков (Hammami H et al., 2008, 2009). Более того, соответствующий анализ показал, что в разных условиях воспроизводства существенно меняется вклад в общую фенотипическую изменчивость характеристик молочной продуктивности паратипической и генетической компонент (Hammami H et al., 2008, 2009; Vignow H.M., 2012). Из этого следует, что одним из условий успешности

применения методов геномной селекции является контроль адаптивного потенциала животных.

В условиях России одной из проблем сниженного адаптивного потенциала молочного скота является высокая инфицированность вирусом бычьего лейкоза (BLV), по результатам многих исследований тесно связанная с повышенной молочной продуктивностью коров (Гладырь Е.А и др., 2011; Виноградова И.А., 2012). В этой связи при отборе и подборе животных в целях получения стад с высокой молочной продуктивностью особую актуальность приобретает развитие методов выявления инфицированных животных этим ретровирусом. К настоящему времени накоплено много данных по применению в этих целях полимеразной цепной реакции (ПЦР) с праймерами к наиболее консервативным участкам провирусного генома (например, Гладырь Е.А. и др., 2011; Зиновьева Н.А. и др., 2012). В то же время, оценка консервативности того или другого гена провирусного генома основывается на ограниченном (не более нескольких десятков) количестве секвенированных полных последовательностей таких структурных генов BLV, как gag, pol, env, представленных в GenBank. Это существенно повышает вероятность ошибок при таком способе идентификации зараженных животных, особенно с учетом высокой скорости и сетевых особенностях эволюции ретровирусов (Llorens C et al., 2009; Venachenhou F et al., 2013). В этой связи особую актуальность приобретают поиски методов, позволяющих прогнозировать наличие «горячих» точек мутирования в провирусном геноме ретровируса, связанных, в частности, с наличием в нем участков ДНК, предрасположенных к формированию неканонических структур ДНК, таких как G4 квадруплексы, которые ассоциированы с повышенной частотой двуцепочечных разрывов ДНК (Sharma S, 2011).

Сложности отбора и подбора животных в целях получения достаточно продуктивных стад с высоким адаптивным потенциалом требуют особого внимания к необходимости упрощения и увеличения надежности применения клеточных технологий для их репродукции. Одним из таких направлений является разработка и стандартизация методов суперовуляции у крупного рогатого скота для получения большого количества эмбрионов с последующей эмбриотрансплантацией реципиентам. Тем не менее, не смотря на то, что работы по эмбриотрансплантациям развиваются в течение нескольких последних десятилетий, до сих пор остаются недостаточно исследованными причины их относительно низкой эффективности по сравнению с ожидаемыми

результатами по генетическому прогрессу стад с использованием таких приемов.

Другое направление применения клеточных технологий для размножения животных с желательным потенциалом продуктивности и адаптивности связано с эмбриональными стволовыми клеточными линиями. К настоящему времени получено несколько сотен эмбриональных стволовых клеточных линий из эпибластов мышей лабораторных линий (D'Hulst С., 2013). Получение таких клеточных линий у крупных млекопитающих оказалось существенно более сложной задачей. Причем причины таких отличий до сих пор остаются недостаточно исследованными. В этой связи, до сих пор остается актуальным получение первичных примордиальных клеточных популяций у крупных млекопитающих, разработка условий для их продолжительного пассирования и изучение возможных причин сниженного потенциала для образования из них постоянных клеточных линий (Ruggeri R. R. et. al., 2012).

Сложности получения постоянных эмбриональных стволовых клеточных линий привели к необходимости поиска других источников клеточных популяций с сохраненным полипотентным потенциалом клеточной дифференцировки. В последние годы в этом направлении активно развиваются методы использования для получения полипотентных стволовых клеток клеточных популяций мезенхимальной стромы, в основном, костного мозга и жировой ткани (Dominici M, 2006). Это направление имеет особое значение, поскольку в ряде исследований была наглядно показана успешность применения мезенхимальных стволовых клеток (МСК) для решения ряда ветеринарных проблем у животных сельскохозяйственных видов (Калиновский А.А., 2012). В то же время, до сих пор недостаточно развиты методы, позволяющие оценивать наличие МСК по их полипотентному потенциалу к клеточной дифференцировке среди мезенхимальных стромальных клеток, выделенных из разных органов. Это, соответственно, сдерживает разработки приемов по воспроизводимому получению МСК от индивидуальных животных для решения проблем применения МСК, в частности, в репродуктивных технологиях.

Целенаправленные разработки для создания единой концепции получения животных с желательным продуктивным и адаптивным потенциалом с использованием геномных технологий, усовершенствования методов применения клеточных технологий для их размножения могли бы

способствовать увеличению эффективности традиционной селекционной работы с животными сельскохозяйственных видов

**Цель** данной работы – оптимизация клеточных и геномных технологий для устойчивого воспроизводства желательных групп млекопитающих на примере крупного рогатого скота (КРС).

Для достижения поставленной цели решались следующие **задачи**:

1. Подбор методов полилокусного генотипирования в целях выявления генофондных отличий на примере животных, принадлежащих к молочным и примитивным породам.

2. Усовершенствование методов выявления животных, инфицированных ретровирусными инфекциями, на примере вируса бычьего лейкоза (BLV).

3. Разработка методов прогноза наиболее полиморфных участков провирусного генома ретровируса с целью оптимизации подбора праймеров для идентификации провирусной ДНК с использованием методов биоинформатики.

4. Оценка применения трансплантации эмбрионов крупного рогатого скота с учетом необходимости предупреждения накопления генетического груза в потомстве.

5. Получение эмбриональных стволовых клеточных популяций из бластоцист крупного рогатого скота, развившихся в культуральных условиях после оплодотворения ооцитов *in vitro*.

6. Оценка генетической гетерогенности представителей эмбриональных стволовых клеточных линий на примере модельного объекта – эмбриональных и герминативных стволовых клеточных линий, полученных от разных линий мышей.

7. Разработка условий выделения и пассирования мезенхимальных стволовых клеток с применением имитирования трехмерной организации тканей для увеличения жизнеспособности клеток и их дифференцировки в желательном направлении.

#### **Научная новизна исследования**

Разработан комплексный подход к выделению животных с желательным фенотипом с использованием методов геномного сканирования, к усовершенствованию методов применения клеточных технологий для репродукции крупного рогатого скота. Впервые получены данные об эффективности использования полилокусного генотипирования по фрагментам ДНК, фланкированным инвертированными повторами ряда микросателлитов, для выявления отличий между специализированными молочными и

примитивными породами крупного рогатого скота. С применением этого же метода впервые оценена внутривидовая дифференциация инфицированных животных вирусом бычьего лейкоза (BLV) с разным потенциалом по молочной продуктивности. Разработана оригинальная мультиплексная RT - PCR тест-система по двум консервативным участкам генов провирусной ДНК *gag* и *pol* с внутренним положительным контролем (*ablim2*, кодирующий белок, принадлежащий к семейству актин-связывающих белков) для выявления в геномах животных провирусной ДНК BLV. Впервые обоснована необходимость и возможность выделения наиболее консервативных участков провирусной ДНК ретровирусов с учетом предрасположенности к формированию неканонических структур ДНК – маркеров геномной нестабильности, в нуклеотидных последовательностях провирусной ДНК ретровируса. Впервые оценены возможности применения различных подходов к индукции суперовуляции у крупного рогатого скота и выявлена положительная статистически достоверная корреляция между частотой встречаемости отдельных цитогенетических аномалий в клетках периферической крови у коров-доноров и количеством полученных от них эмбрионов. Подобраны условия для получения первичных популяций эмбриональных стволовых клеток из бластоцист крупного рогатого скота, полученных при оплодотворении ооцитов *in vitro*. Впервые выявлены отличия по успешности трансфекции плазмидой pEGFP-N1 ооцитов, фетальных фибробластов и клеток кумулуса, позволяющие предположить определенную агрессивность популяции сперматозоидов по отношению к ДНК плазмиды, используемых при оплодотворении ооцитов. Впервые разработаны методы выделения и пассирования клеток, выделенных из костного мозга и жировой ткани, с их иммобилизацией на 3-х мерных матриксах из желатиновых криогелей, доказана их принадлежность к мезенхимальным стволовым клеткам путем успешного создания условий и выявления маркеров дифференцировки клеток в хондроциты и адипоциты.

#### **Защищаемые положения**

1. Полилокусное генотипирование с применением ISSR-PCR (Inter Simple Sequence Repeats) маркеров позволяет выявлять отличия между животными, принадлежащими к специализированным молочным и примитивным породам КРС.

2. Применение в Real-time PCR комплекса праймеров к разным генам провирусной ДНК BLV на ряду с «внутренним контролем» к структурному гену

генома хозяина (КРС) позволяет увеличить надежность выявления инфицированных BLV животных по сравнению с разработанной для исследований тест-системой GenPak™ DNA PCR test (ООО «Лаборатория Изоген»).

3. Прогноз консервативности участков провирусного генома ретровирусов, выполняемый при подборе праймеров для их выявления, необходимо проводить с учетом контекстных особенностей провирусного генома и предрасположенности его различных участков к формированию неканонических структур ДНК, в частности, G4 квадруплексов маркеров геномной нестабильности.

4. Применение технологий эмбриотрансплантаций должно сопровождаться цитогенетическим контролем коров-доноров эмбрионов для предупреждения накопления генетического груза в потомстве.

5. Получение эмбриональных стволовых клеточных линий с целью их использования в биотехнологических процедурах требует контроля их генетической стабильности, отличающейся у клеточных популяций разного происхождения.

6. Использование 3-мерных матриц для иммобилизации мезенхимальных стволовых клеток позволяет выделять и поддерживать клеточные клоны, способные к дифференцировке в производные мезенхимального листа, проявляя таким образом, идентификационные характеристики мезенхимальных стволовых клеток.

#### **Практическая значимость исследования**

Данные о высокой эффективности дифференциации животных по специализации в отношении молочной продуктивности при использовании методов геномного сканирования с применением генотипирования по фрагментам ДНК в диапазоне длин до 2000 пар оснований (п.о.), фланкированных инвертированными повторами микросателлитов, могут непосредственно применяться при отборе и подборе животных с целью повышения их потенциала по молочной продуктивности. На практике подтверждена относительно повышенная эффективность использования для выявления инфицированных BLV животных разработанной оригинальной тест-системы по сравнению с имеющейся для исследований GenPak™ DNA PCR test (ООО «Лаборатория Изоген»). Метод прогноза «горячих» точек мутирования на основании выявления нуклеотидных последовательностей с высокой предрасположенностью к формированию неканонических структур



ДНК, в частности, G4 квадруплексов, может быть прямо использован для разработке праймеров при создании тест-систем на основе ПЦР для выявления интеграции провирусной ДНК патогенных ретровирусов. Полученные экспериментальные данные о положительной корреляции между частотой встречаемости отдельных цитогенетических аномалий в клетках периферической крови коров-доноров и количеством полученных от них эмбрионов свидетельствует о необходимости обязательного контроля при использовании биотехнологических процедур в целях предупреждения накопления генетических дефектов в стадах крупного рогатого скота. Данные, полученные при выделении и культивировании эмбриональных стволовых клеток крупного рогатого скота, позволяют разработать методику по получению и поддержанию культур этих клеток с целью их дальнейшего использования в биотехнологических процессах. Разработанная методика культивирования и дифференцировки мезенхимных стволовых клеток, иммобилизованных на 3-х мерных матриксах, в хондроциты позволяет использовать данные клетки для получения тканеинженерных конструкций.

Результаты исследований включены в 8 методических положений, 2 методических пособия, 3 методические рекомендации утвержденных на секции «Ветеринарная биотехнология» Отделения ветеринарной медицины Россельхозакадемии академиком-секретарем А.М. Смирновым.

Результаты исследования и методология может быть использована разработчиками и производителями диагностических и лечебных средств для ветеринарии.

**Результаты работы использованы** в курсах лекций по инновационным биотехнологиям для бакалавров, магистров и аспирантов зооинженерного факультета РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева.

#### **Апробация работы**

Материалы диссертационного исследования представлены, доложены и обсуждены:

— в виде ежегодных отчетов по темам государственных заданий на заседаниях ученого совета и методической комиссии ГНУ ВНИТИБП Россельхозакадемии (2009-2012 гг.);

— в виде ежегодных отчетов по темам государственных заданий на заседаниях ученого совета ГНУ ЦЭЭРБ Россельхозакадемии (2012-2013 гг.);

— на секции «Ветеринарная биотехнология» отделения ветеринарной медицины Россельхозакадемии;

— на международных и Всероссийских конференциях и конгрессах, ниже представлены основные из них: 60th AAAAI Annual Meeting (San Francisco, March 19-23, 2004); Международной конференции «Биология стволовых клеток: фундаментальные аспекты» (г.Москва, 2005); Международной научной конференции "Наследие Н.И. Вавилова - фундамент развития отечественного и мирового сельского хозяйства» (г.Москва, ноябрь 2007); I Научно-практической конференции по профпатологии «Актуальные вопросы профпатологии»(г. Северодвинск, 2007); IV Международной научно-практической конференции (г.Томск, апрель 2007); IRPA regional congress for Central and Eastern Europe (Romania, 2007); Международном конгрессе «Восстановительная медицина и реабилитация-2007»; Российско-китайской научно-практической конференции «Диагностика и профилактика инфекционных болезней животных» (Харбин, 10-13 июля 2009 г); Международной научно-практической конференции, посвященной 40-летию ВНИТИБП РАСХН «Научные основы производства ветеринарных биологических препаратов» (Щелково, 9-10 декабря 2009 г.); Международном Конгресс-Партнеринге и Выставке по биотехнологии и биоэнергетике (Москва, 13-15 апреля 2010); II-Международной научно-практической конференции «Молодые ученые в решении актуальных проблем в науке» (Владикавказ, 2011); III международной научно-практической конференции «Молодые ученые в решении актуальных проблем науки» (Владикавказ, 2012); Международной научно-практической конференции "Научные основы производства и обеспечения качества биологических препаратов для АПК" (Щелково, 5-7 декабря 2012); V Международной научно-практической конференции « Ветеринарніпрепарати: Розробка, контроль якості та застосування» (м.Львів, 2-4 жовтня 2013); Первом Южно-Российском международном ветеринарном конгрессе (г. Ростов-на-Дону 26-27.09.2013); II Международной научно- практической конференции: «Новейшие достижения биотехнологии» (м.Кіев 24-25 жовтня 2013); III Международной научно-практической конференции "Сельскохозяйственные науки и агропромышленный комплекс на рубеже веков" (Новосибирск, 27 сентября 2013 г.); 2013" (Москва, 19 февраля 2013); VII Московском международном конгрессе "Биотехнология: состояние и перспективы развития" (Москва, 19-22 марта 2013г.); VII Всероссийской научно-практической конференции молодых ученых «Наука и устойчивое развитие» (Нальчик 2013); II конференция участников российского биомаркерного консорциума "БИОМАРКЕРЫ Московская конференция по

молекулярной вычислительной биологии «МССМВ'13» (25–28 июля 2013 года, Москва).

Разработки удостоены 8 дипломами, 7 золотыми и одной бронзовой медалью Российской агропромышленной выставки «Золотая осень», Москва (2010 г., 2012 г., 2013 г.).

### **Публикации**

Материалы диссертационного исследования опубликованы в одной монографии, одних методических рекомендациях, 82 печатных работах, из которых 25 статей в научных журналах, включающих 17 статей в журналах из перечня, рекомендованного ВАК Минобрнауки России для публикации материалов докторских диссертаций, остальные работы опубликованы в сборниках научных трудов, материалах международных и Всероссийских научных конгрессов и конференций. По результатам исследований получено 3 патента РФ на изобретение, одно положительное решение на выдачу патента РФ на полезную модель.

### **Структура и объем диссертации**

Диссертационная работа изложена на 287 страницах, содержит 38 рисунков, 23 таблицы и состоит из следующих разделов: введения, обзора литературы, материалов и методов исследования, результатов и их обсуждения, практических рекомендаций, выводов и списка литературы, включающего 430 цитируемых источника, приложения.

### **Личный вклад автора**

Заключается в формулировании проблемы, постановке цели и задач исследований, методологическом обосновании путей решения поставленных задач, непосредственном планировании экспериментов и выполнении исследований, обобщении и интерпретации результатов, подготовке научных публикаций и разработке методических документов.

### **Благодарности**

Автор выражает благодарность научному консультанту, директору ВНИТИБП, академику Россельхозакадемии, академику НААН Украины Анатолию Яковлевичу Самуйленко. Благодарю за помощь в работе Е.В. Косовскую; Н.С. Добровольского, Е.В. Корниенко, М.С. Краснова; Г.П. Маленко, И.И. Нестерова и других сотрудников Центра. Особо признателен за неоценимую помощь в подготовке материалов диссертации к защите академику Россельхозакадемии (иностраннный член) В.И. Глазко и д.с.-х наук Т.Т. Глазко.

## Содержание работы

**Глава 1. Обзор литературы.** В обзоре литературы приводятся сведения о состоянии генетических ресурсов крупного рогатого скота и необходимости разработок геномных и клеточных методах управления ими. Рассматриваются используемые в этих целях современные методы геномного сканирования, идентификации наиболее распространенных ретровирусных инфекций, приемы по усовершенствованию эмбриотрансплантаций и получения эмбриональных стволовых клеток, а также преимущества использования мезенхимальных стволовых клеток, в частности, для получения генетически модифицированных животных.

## Глава 2. Объекты и методы исследования

**Геномные технологии.** Исследования выполнялись в двух направлениях: (1) подбор условий для генотипирования микросателлитных локусов, рекомендованных ISAG (International Society of Animal Genetics - ISAG) для генотипирования крупного рогатого скота, и (2) сравнительный анализ генофондов 8-ми пород крупного рогатого скота с применением полилокусного генотипирования по ISSR-PCR (Inter-Simple Sequence Repeat — ISSR-PCR) маркерам. В работу включены следующие животные: черно-пестрый голштинизированный скот СПК «Заря»; 2- красный эстонский скот (Псковская обл, д. Дубровы); 3 - айширская порода КРС (МО); 4-казахская белоголовая (г. Волгоград); 5- тагильская аборигенная порода; 6- якутские коровы (р. Саха); 7- зебувидный скот (МО Снегири); 8- группа черно-пестрого голштинизированного скота вивария НУФЕ-VC{F имени К.А. Тимирязева. Подбирались условия для генотипирования по ряду микросателлитных локусов, рекомендованных ISAG для исключения ошибок происхождения у крупного рогатого скота. Подбор выполнялся на основании данных фирмы «Прикладные биосистемы» ([www.appliedbiosystems.com](http://www.appliedbiosystems.com)).

Аmplификацию фрагментов ДНК осуществляли методом ISSR-PCR. В основном, программа амплификации была следующей: 94°C\*2'; (94°C\*30", индивидуальная температура отжига \*30", 72°C\*30")\*35; 72°C\*5'. Коррекцию условий выполняли отдельно для каждого микросателлитного локуса. Электрофорез проводили в буфере TBE при напряженности электрического поля 70 V. Сканирование проводили под ультрафиолетом ( $\lambda = 312$  нм) при помощи трансиллюминатора. Концентрацию геномной ДНК измеряли с помощью спектрофотометра и в дальнейшей работе использовали препараты с максимальной концентрацией. В качестве праймеров использовали ди- и

тринуклеотидные коровые мотивы микросателлитов с якорными нуклеотидами: (AG)<sub>9</sub>C; (GA)<sub>9</sub>C; (GAG)<sub>6</sub>C; (CTC)<sub>6</sub>C; (AGC)<sub>6</sub>G; (ACC)<sub>6</sub>G.

Математическую обработку осуществляли с использованием компьютерной программы TFPGA. Расчет индекса PIC (Polymorphic Information Content) выполнялся по формуле для диалельных локусов, для которых  $PIC=2f(1-f)$ , где  $f$  – частота одного из двух аллелей. Поскольку ISSR-PCR маркеры имеют доминантный характер проявления по присутствию продукта амплификации,  $f$  рассчитывали по формуле  $f=\sqrt{R}$ , где  $R$  – частота встречаемости животных среди исследованных, у которых в спектрах продуктов амплификации отсутствовал фрагмент ДНК данной длины. Значение  $R$  рассматривалась как доля гомозигот по рецессивному аллелю.

При усовершенствовании мультиплексовой RT тест системы по двум генам провирусной ДНК BLV за основу была взята разработанная система праймеров и соответствующая ей программа амплификации. RT-PCR проводили с использованием реагентов производства компании Диалат. Программа амплификации была подобрана по следующей схеме: 94°Сx5'; (94°Сx20", 60°Сx30", 72°Сx20")x35 циклов; 72°Сx5'. В дальнейшем количество циклов в реакции амплификации было увеличено до 43.

В качестве способа детекции продуктов амплификации были выбраны TaqMan зонды, разработанные на основе консервативных участков амплифицируемых фрагментов генов *gag* и *pol* BLV и амплифицируемого фрагмента гена *abl1m2*. В связи с проблемами при детекции амплифицируемого фрагмента гена *pol* внесены изменения в конструкцию соответствующего зонда: уменьшена длина и введены модифицированные LNA (locked nucleic acids). В процессе оптимизации тест-системы проводился электрофорез продуктов амплификации в 2% агарозном геле. Воспроизводимость разработанного метода оценивалась на повторной детекции провирусной ДНК BLV у 98 дочерей 11-ти быков хозяйства «Можайское» Московской области.

Для сравнительного анализа представленности нуклеотидных замен в различных позициях генома провирусной ДНК BLV выполнялся сравнительный анализ отношения частот несинонимических замен к синонимическим (отношение Кн/с) в кодирующих последовательностях генов *env* и *pol*. В гене *env* нуклеотидные замены рассчитывались отдельно в функционально важных регионах этого гена, кодирующих гликопротеины gp51 и gp30. Использовались последовательности, опубликованные в базе данных GenBank(AF547184.2 и D00647.1). Поиск гомологии в архиве повторов проводился с применением

программ RepeatMasker и Gini (<http://www.repeatmasker.org/>, <http://www.girinst.org/censor/>). Локализация нуклеотидных последовательностей, потенциально предрасположенных к образованию таких неканонических структур ДНК, как G4 квадруплексы, в секвенированных фрагментах оценивалась с использованием программы QGRS (Quadruplex forming G-Rich Sequences) Mapper.

**Клеточные технологии.** Исследования по суперовуляции и эмбриотрансплантациям выполняли на поголовье здоровых коров чернопестрой породы в условиях промышленного молочного комплекса. Опытные группы животных формировали по принципу пар-аналогов исходя из физиологического состояния, возраста, продуктивности, живой массы и стадии полового цикла. Для исследований подбирали животных, в возрасте 4-5 лет, которые после отела в течение сервис-периода (3 месяца) проявляли полноценную половую цикличность. Всего было сформировано три опытные группы. К коровам-донорам первой группы применяли стандартную схему индукции суперовуляции, включающую внутримышечное введение гормонов ФСГ на 9-, 10-, 11-, 12-е сутки спонтанного эстрального цикла в дозах 12, 8, 4, 4 мг/гол/сут и простагландина магэстрофана – 4 мл/гол внутримышечно однократно, на 12-е сутки. Второй и третьей группам коров-доноров в дополнение к стандартной схеме внутримышечно вводили тималин 30 мг/гол/сут на 1-5-е и 5-10-е сутки спонтанного полового цикла.

Для оценки возможного вклада нестабильных геномов коров доноров в группы животных, получаемых в результате эмбриотрансплантаций выполнен сравнительный анализ между рядом характеристик нестабильности генетического аппарата коров и количеством вымываемых у них эмбрионов. Кровь для цитогенетических исследований забирали из яремной вены животных перед началом гормональной стимуляции суперовуляции. Краткосрочную культуру клеток крови готовили обычным способом на среде Хенкса-199 с добавлением антибиотиков и фитогемагглютина. Не добавляли ни колхицин, ни колцемид. Клетки культивировали на протяжении 72 часов в термостате при температуре 37°C. Потом суспензию центрифугировали (1000 об/мин, 10 минут), инкубировали в гипоническом растворе KCl (0,54%) на протяжении 50 минут, фиксировали смесью метилового спирта с уксусной кислотой в соотношении 3:1. Суспензию клеток наносили на чистые, охлажденные предметные стекла. Препараты окрашивали красителем Гимза. В клетках

периферической крови крупного рогатого скота оценивали следующие цитогенетические характеристики: частоты встречаемости метафаз с ассоциациями хромосом по центромерным районам по типу робертсоновских транслокаций; хромосомными aberrациями (хромосомные, хроматидные разрывы; кольцевые хромосомы, фрагменты); асинхронное расщепление центромерных районов хромосом; доли полиплоидных и анеуплоидных клеток. В общем, в анализ по метафазным пластинкам включали следующие цитогенетические характеристики: анеуплоидия (А); полиплоидия (ПП); частота встречаемости метафаз с хромосомными aberrациями (хромосомные, хроматидные разрывы; фрагменты; кольцевые хромосомы) (ХА); с межхромосомными ассоциациями по типу робертсоновских транслокаций (МАРБ) и с асинхронностью расщепления центромерных районов хроматид (АРЦРХ). Их частоты встречаемости рассчитывали относительно всей выборки просмотренных метафаз. Количество двуядерных лимфоцитов (ДЛ) и одноядерных лимфоцитов с микроядрами (ЛМЯ) подсчитывали на тех же препаратах в клетках с сохраненной цитоплазмой. Количество митозов (митотический индекс - МИ), частоты встречаемости ДЛ, ЛМЯ рассчитывали на 1000 клеток. Частота встречаемости анеуплоидных клеток рассчитывалась в двух вариантах: доля всех вариантов анеуплоидных клеток (А1) среди исследованных и с учетом только анеуплоидных клеток с числом хромосом  $2n+1$  (АП). Статистическую обработку полученных данных проводили стандартными методами. Межгрупповые отличия оценивали по критерию Стьюдента. Коэффициенты корреляции и их достоверность оценивали при использовании стандартной компьютерной программы Statistica.

При получении эмбриональных стволовых клеток крупного рогатого скота использовали восьми- и девятидневные бластоцисты крупного рогатого скота. Их получали путем дозревания и оплодотворения ооцитов *in vitro* с дальнейшим культивированием предполагаемых эмбрионов до необходимого срока. Для этого комплексы ооцит-кумулюс (КОК) выделяли из поверхностных антральных фолликулов диаметром 2–6 мм. Для дозревания отбирались ооциты средней величины с равномерно гранулированной ооплазмой, окруженные многослойным плотным или несколько разрыхленным кумулюсом. Для дозревания ооцитов крупного рогатого скота использовали среду 199 с добавлением пирувата натрия, L-глутамина, L-цистеина, хорионического гонадотропина, фолликулостимулирующего гормона, эстрадиола-17 $\beta$  и 10% фетальной сыворотки крови крупного рогатого скота. Для оплодотворения

использовали среду TALP-Fert (Parrish et al., 1986, 1988; TF). Для культивирования эмбрионов использовали модифицированную среду mSOF соответственно рецептуре Tervit *et al.* (1972), за исключением глюкозы и BSA, но с добавлением аминокислот и 5 % FCS. В возрасте восьми или девяти суток после оплодотворения для выделения внутренней клеточной массы (ВКМ) отбирали расширенные или выплывшие из блестящей оболочки бластоцисты с нормальной морфологией. С расширенных бластоцист блестящую оболочку удаляли при помощи проназы. Полученные бластоцисты проводили последовательно через 7-8 капель модифицированной среды TALP-HEPES (Bavister, Yanagimachi, 1977), в которой в последствии проходило выделение ВКМ. Разделение трофобласта и клеток ВКМ проводилось при помощи двух игл (30 g) от шприцов объемом 1 мл. Выделенные эмбриобласты переносили в 24-х луночные планшеты с фидерным слоем. В качестве фидерного слоя использовали фетальные фибробласты КРС первого пассажа, обработанные митомицином С. Прикрепление ВКМ к фидерному слою происходило в течение 24-48 часов. Культивирование эмбриональных стволовых клеток КРС проводили в среде DMEM с 20% фетальной сыворотки крови КРС, L-глутамином, неспецифичными аминокислотами, 2-меркаптоэтанолом и bFGF при 38,5 °C с 5% CO<sub>2</sub>. Среду заменяли через каждые два дня.

Для выделения мезинхимальных стволовых клеток (МСК) использовали материалы полученные с бойни мясокомбината. Вымывание костного мозга проводилось при помощи шприца, содержащего 5 мл среды 199 с 3-х кратной концентрацией гентамицина. Полученную суспензию переносили при помощи серологической пипетки в пробирки и центрифугировали в течение 15 мин при 1200 об/мин. Супернатант удаляли при помощи серологической пипетки, полученный осадок разбавляли ростовой средой DMEM/F12 с глутамином и перепосили в матрасы для культивирования. На 10 сутки образовался монослой конфлюэнтностью 100%, после чего был произведен перенос культуры на матрасы с добавлением 5нг/мл bFGF и 15% сыворотки. Через 3 дня, после достижения монослоя, клетки были пассированы еще раз. После этого по достижении монослоем 90% конфлюэнтности был поставлен опыт по хондрогенной дифференцировке. Для этого трипсионизированные и ресуспендированные клетки помещали в криогель, находящийся в чашках Петри диаметром 60мм. Клетки культивировали в течение 6 дней, смену среды проводили раз в три дня. Далее криогель в стерильных условиях разрезали на кусочки и помещали в 24-луночные планшеты. Две трети образцов были



помещены в дифференцировочную среду Chondrogenesismedia, одна треть – в среду DMEM/F12 с 10 % FBS и L-глутамином. Смена среды осуществлялась раз в 2-3 дня. Фотодокументацию проводили на 11 день культивирования микроскопе инвертированном Nikon Ti-U. Фиксация образцов производилась 4% формалином на 14 день. В дальнейшем полученные образцы изучались на наличие хондрогенной дифференцировки и формирование матрикса с помощью окраски альциановым голубым и световой микроскопии на парафиновых срезах 3-х мерного криогеля.

### **Глава 3. Собственные результаты и их обсуждение**

**1. Полилокусное генотипирование представителей различных пород крупного рогатого скота.** В результате выполненных исследований подобраны условия для генотипирования крупного рогатого скота черно-пестрой голштинизированной породы по локусам микросателлитов, рекомендованным ISAG для исключения ошибок происхождения у крупного рогатого скота. Подбор выполнялся на основании данных фирмы «Прикладные биосистемы» ([www.appliedbiosystems.com](http://www.appliedbiosystems.com)), которая по согласованию с Food and Agricultural Organization (FAO) и International Society of Animal Genetics (ISAG) для крупного рогатого скота разработала тест-систему для генотипирования 11 динуклеотидных микросателлитов (TGLA227, BM2113, TGLA53, ETH10, SPS115, TGLA126, TGLA122, INRA23, ETH3, ETH225, BM1824). У исследованной группы (10 голов) голштинизированного крупного рогатого скота не выявлено полиморфизма по локусам BM1824 (присутствовал аллель длиной в 188 нуклеотидов), ETH10 (аллель длиной в 219 нуклеотидов), TGLA122 (аллель 143 нуклеотида), TGLA227 (аллель 97 нуклеотидов), BM2113 (аллель длиной в 135 нуклеотидов), TGLA126 (аллель длиной в 117 нуклеотидов), SPS115 (аллель длиной в 248 нуклеотидов). Только по двум микросателлитам был обнаружен полиморфизм – два аллеля по локусу INRA023, длиной в 206 и 214 пар нуклеотидов, и по локусу ETH225, длиной в 148 и в 150 пар нуклеотидов. По-видимому, наблюдаемый низкий уровень полиморфизма был обусловлен малой численностью исследованных животных, а также родственными взаимоотношениями между ними.

В целях увеличения выявляемого генетического разнообразия далее были использованы оценки полиморфизма длин фрагментов ДНК, фланкированных короткими инвертированными повторами (ISSR-PCR - Inter-Simple Sequence Repeat маркеры). Помимо того, что этот метод предоставляет возможность одновременно оценивать полиморфизм различных участков генома, он

достаточно прост, не требует специального оборудования и, в отличие от генотипирования ди- и тринуклеотидных микросателлитов, существенных финансовых вложений.

В результате выполненных исследований получены следующие данные. В спектрах продуктов амплификации при применении в качестве ПЦР праймеров ди- и тринуклеотидных микросателлитов для каждой группы КРС выявлялись свои, породоспецифичные особенности количества фрагментов ДНК разной длины и их сочетаний. Суммарно количество продуктов амплификации (ампликонов) и их полиморфизм, для каждой из исследованных групп КРС в спектрах использованных праймеров представлены в таблице 1.

**Таблица 1**

Полиморфное информационное содержание (PIC) спектров продуктов амплификации ди- и тринуклеотидных праймеров (ISSR-PCR) у групп исследованных КРС. Для каждой группы КРС PIC рассчитывался отдельно по специфичному для нее спектру продуктов амплификации, выявленному по указанному праймеру.

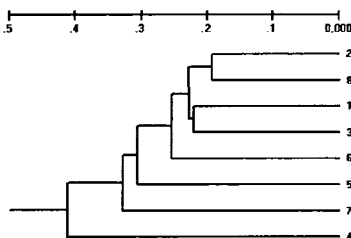
Праймер	Якутские коровы	Казахская белоголовая	Зебувидный скот	Тагильская аборигенная порода	Красный эстонский скот	Голштинизированный скот («Заря»)	Айрширская порода	Голштинизированный скот
(AG)9C	0,0502	0,0000	0,0690	0,2009	0,2518	0,2074	0,1173	0,1887
(GA)9C	0,0086	0,2070	0,1277	0,2123	0,0966	0,0000	0,1918	0,1028
(GAG)6C	0,0000	0,1869	0,1667	0,0610	0,2227	0,0845	0,0804	0,1021
(CTC)6C	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0922	0,0000
(AGC)6G	0,0000	0,0000	0,1419	0,0000	0,1575	0,0000	0,1080	0,0000
(ACC)6G	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
В среднем	0,0697	0,0647	0,1277	0,0787	0,1871	0,1133	0,1290	0,0972

Спектры ампликонов, полученные с применением в ПЦР разных праймеров, существенно отличались между собой по пределам длин выявляемых фрагментов ДНК, а по спектрам праймеров еще и между породами. По значениям полиморфного информационного содержания (PIC) выявленные спектры ампликонов различаются у всех анализируемых групп. Особенно интересен в данном случае полиморфное информационное содержание праймера (СТС)6С у айрширской породы, составляющее 0,0922 против 0,0000 у остальных групп КРС.

Полученные данные свидетельствуют о том, что каждая группа КРС имеет свои специфические особенности полиморфизма спектра ампликонов,

выявленных с применением используемых праймеров. Тем не менее, обнаруживается определенное сходство усредненных оценок PIC по всем ISSR-PCR маркерам для представителей отдельных пород: 0,1290 и 0,1277 для образцов зебувидного скота и айшпирской породы, соответственно, при том, что значения PIC для каждого праймера в отдельности не являются сходными (табл. 1), что в свою очередь объясняется уникальностью продуктов амплификации для каждой из исследованных групп животных.

Уникальность сочетаний продуктов амплификации ДНК, полученных с использованием разных праймеров, обнаруживается при построении дендрограммы (с помощью программы TFPGA) на основании значений генетических расстояний М. Нея, рассчитанных по частотам их встречаемости у исследованных групп крупного рогатого скота. На рисунке 1 представлена дендрограмма, построенная на основании анализа спектров продуктов амплификации по ISSR-PCR маркерам.



**Рисунок 1.** Дендрограмма построенная на основании полученных значений генетических расстояний М. Нея, рассчитанных по частотам встречаемости продуктов амплификации ДНК спектров праймеров нуклеотидных последовательностей (AG)<sub>9</sub>C; (GA)<sub>9</sub>C; (GAG)<sub>6</sub>C; (CTC)<sub>6</sub>C; (AGC)<sub>6</sub>G; (ACC)<sub>6</sub>G (ISSR-PCR маркеры). Номерами обозначены исследованные группы крупного рогатого скота: 1 - черно-пестрый голштинизированный скот СПК «Заря»; 2- красный эстонский скот; 3 - айшпирская порода; 4-казахская белоголовая; 5- тагильская аборигенная порода; 6-якутские коровы; 7- зебувидный скот; 8-голландская порода

Полученная дендрограмм подразбивается на два крупных кластера (рисунок 1), один из которых разбивается на 2 подкластера. Первый кластер образуется подкластером, состоящим из групп №2 красного эстонского скота, №8 голштинской породы и второго подкластера из черно-пестрого голштинизированного скота СПК «Заря» и №3 айшпирской породы. В общем,

все четыре группы представляют специализированный скот молочного направления продуктивности. Группы 6, 5, 7 и 4 представляют менее специализированные группы животных, но традиционно с более высоким адаптивным потенциалом (4 - казахская белоголовая; 5 - тагильская аборигенная порода; 6 - якутские коровы; 7 - зебувидный скот).

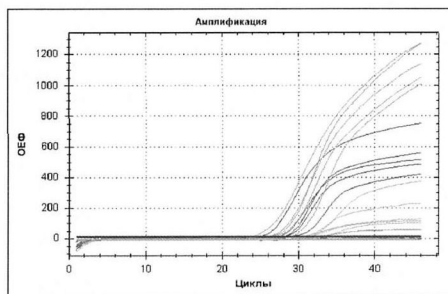
Следует отметить, что применение предложенных FAO микросателлитных локусов для дифференциации крупного рогатого скота оказывается менее эффективным по сравнению с полилокусным генотипированием по фрагментам ДНК, фланкированным инвертированными повторами микросателлитов, в связи с большим количеством генотипируемых локусов по ISSR-PCR маркерам и относительно более высоким уровнем полиморфизма некоторых из них. Полилокусное генотипирование, выполненное с использованием разных праймеров в полимеразной цепной реакции, позволяет выявлять спектры продуктов амплификации ДНК, специфичные для каждого праймера и отражающие особенности распределения его инвертированных повторов в исследуемых геномных ДНК. Дендрограмма, построенная на основании оценок ISSR-PCR, свидетельствует о тесной связи между выявленным полиморфизмом по исследованным фрагментам ДНК, и дифференциацией генофондов животных по направлению и уровню специализации. Полученные данные позволяют выделять и создавать тест-систему, основанную на выявленных полилокусных спектрах ISSR-PCR маркеров, позволяющих направленно контролировать консолидацию групп животных с учетом особенностей их породной принадлежности.

**2. Идентификация интеграции провирусной ДНК вируса BLV в геномах крупного рогатого скота.** В ходе исследований опробована и показана высокая воспроизводимость идентификации BLV в геномах крупного рогатого скота при помощи методики ПЦР в реальном времени с использованием в качестве праймеров фрагментов генов провируса и внутреннего контроля по собственному гену генома крупного рогатого скота.

Выполненный повторный анализ присутствия провирусной ДНК BLV в геномах 98 коров ЗАО «Можайское» подтвердил надежность разработанного метода. Среди исследованных животных, потомстве 11 быков, выделены две группы коров, носителей провирусной ДНК: одна группа с относительно повышенной молочной продуктивностью (более 4,5 тыс.кг общий удой) является потомством, в основном, быков Диллер, Раундан, Зюйд, Чип; другая, с низким общим удоем (около 3 тыс.кг) – дочери быков Марс, Дарий, Арт.

Полученные данные свидетельствуют о том, что чувствительность коров к инфицированию BLV может быть ассоциирована как с повышенной молочной продуктивностью, так и, по-видимому, с общим сниженным адаптивным потенциалом к условиям содержания. В результате получена воспроизводимая схема амплификации в мультиплекной системе запланированных участков двух генов провирусной ДНК BLV и одного гена генома крупного рогатого скота, кодирующего белок, принадлежащий к семейству белков, связывающих цитоплазматический актин (рис. 2).

Рисунок 2. График результатов разработанной мультиплекной амплификации в RT-PCR участков гена *gag* BLV (верхняя группа линий), средняя группа линий – гена *pol* BLV, нижняя группа линий – результат амплификации внутреннего контроля - гена *ablim2* *Bos Taurus*.



Совершенствование метода мультиплекной амплификации в RT-PCR участков генов *gag* и *pol* BLV, гена *ablim2* генома крупного рогатого скота на основе подбора консервативных участков, соответствующих флюорохромомам, режима полимеразной цепной реакции в реальном времени (RT-PCR), направленных модификаций праймеров позволяет получать воспроизводимую систему детекции с потенциально возможной оценкой относительного количества вирусной РНК BLV в анализируемом образце.

В то же время, консервативные участки провирусного генома были подобраны на основании анализа групп секвенированных провирусных последовательностей, представленных в GenBank, количество которых не превышает нескольких десятков. В целях увеличения надежности разработанного метода мультиплекной детекции вируса бычьего лейкоза выполнялся также анализ особенностей структурно-функциональной организации различных участков вирусного генома. Анализ нуклеотидных

последовательностей генов провирусной ДНК вируса BLV позволил получить следующие данные. В участке гена *env* длиной в 1548 п.о. выявляется 4 непрерывающихся последовательности, предрасположенные к формированию G4 квадруплексов, и 105 перекрывающихся, большая часть которых локализована в трех сегментах этого гена: между 272 и 296 нуклеотидом (34 варианта), 1080 – 1109 нуклеотидом (19 вариантов) и между 1080 и 1272 нуклеотидом (69 вариантов).

Нуклеотидная последовательность *env* кодирует с 1 нуклеотида по 99 сигнальный пептид в 33 аминокислоты, с 100 по 901 – оболочечный гликопротеин gp51, включающий 301 аминокислоту, который начинается с триптофана, и трансмембранный гликопротеин gp30, кодирующий 302 по 515 аминокислоты, начиная с серина (позиции в полной последовательности гена *env* с 904 позиции по 1545 нуклеотид). 34 перекрывающихся варианта потенциальных G4 квадруплексов (последовательности между 272 и 296 нуклеотидами, 91 – 99 аминокислоты) совпадают с участком конформационного эпитопа, связанного с вирусной инфекционностью. Остальные два сегмента с высокой плотностью перекрывающихся потенциальными G4 квадруплексами локализованы в трансмембранном гликопротеине gp30, с 360 аминокислоты по 424, что совпадает с функционально важными доменами этого белка. Трансмембранный пептид - gp30, выполняет ключевую роль в слиянии клеток, поскольку дестабилизирует плазматическую мембрану клеток-мишеней благодаря своей способности включаться в билипидный слой. Кроме роли в клеточном слиянии, gp30 участвует в передаче сигнала через мотив своего цитоплазматического конца тирозин-индуцируемого рецептора (ITAM).

В гене *pol* длиной в 2538 п.о. обнаруживается 10 непрерывающихся потенциальных последовательностей G4 квадруплекса и 49 перекрывающихся, что существенно меньше плотности распределения последних по сравнению с геном *env*.

Выполнен также сравнительный анализ представленности нуклеотидных замен в различных позициях генов *env* и *pol* BLV генома провирусной ДНК и отношения частот несинонимических замен к синонимическим (отношение Кн/с) в кодирующих последовательностях этих генов. Получены следующие данные. Частота нуклеотидных замен в нуклеотидной последовательности, кодирующей gp51, 0.1766, Кн/с - 0.5955; кодирующей gp30 – 0.1636 с Кн/с - 0.3636. Расчеты получены на основании анализа 52 полноразмерных последовательностей gp51 и gp30, представленных в базе данных GenBank.

Полученные данные свидетельствуют о том, что частота несинонимических замен в последовательности, кодирующей *gp51*, существенно выше по сравнению с *gp30*, несмотря на сходство средних частот нуклеотидных замен суммарно по этим кодирующим последовательностям. Это предполагает наличие более интенсивного давления «очищающего» отбора на последовательность *gp30* по сравнению с *gp51*. Можно ожидать, что такое повышенное давление обусловлено принадлежностью гликопротеина *gp30* к трансмембранным белкам. В районах гена *pol* с координатами 2325-2818 нуклеотид провирусного генома (29 последовательностей), 3986-4218 нуклеотид (35 последовательностей) 4499-4631 (33 последовательности) частоты нуклеотидных замен на один нуклеотид оказались близкими (0.1417; 0.1552; 0.1654 соответственно), за исключением фрагмента с координатами 4257-4393 (38 последовательностей), в котором средний уровень замен нуклеотидов достиг высокого значения - 0.2774. Наименьшее значение  $K_n/c$  выявлено в районе 3986-4218 (0.2414). Близкие к обнаруженному в гене *gp30* - в районах *pol* гена с координатами 2325-2818 и 4499-4631 ( $K_n/c$  0.4000 и 0.4667, соответственно). Наиболее высокие значения  $K_n/c$  (0.9000), наблюдались в гене *pol* в области с координатами 4257-4393, здесь же обнаружена самая высокая средняя частота нуклеотидных замен на нуклеотид. Близкое к единице соотношение частот встречаемости несинонимических и синонимических замен в этом участке может указывать на отсутствие интенсивного влияния «очищающего» отбора и, следовательно, возрастает вероятность ошибочных результатов при использовании этого района для диагностики интеграции провирусной ДНК в геном животных. В районах с повышенной плотностью потенциальных G4 квадруплексов наблюдается высокая частота нуклеотидных замен на один нуклеотид (0.6667) с относительно высокими значениями  $K_n/c$  (0.7143) В гене *pol* в области 4256-42780 локализованы две перекрывающиеся последовательности, потенциально предрасположенные к образованию G4 квадруплексов.

Полученные данные свидетельствуют о существенных отличиях в соотношениях между несинонимическими и синонимическими заменами по длинам рассмотренных генов провирусной ДНК, что, по-видимому, может отражать разную интенсивность «очищающего» отбора.

Выполнен поиск участков гомологии к генам *env* и *pol* BLV в базах данных секвенированных последовательностей с применением программ RepeatMasker и Gini (<http://www.repeatmasker.org/>, <http://www.girinst.org/censor/>).

Обнаружено, что в гене *env* такие участки не выявляются, а в гене *pol* BLV присутствуют в следующем порядке, указанном в таблице 2.

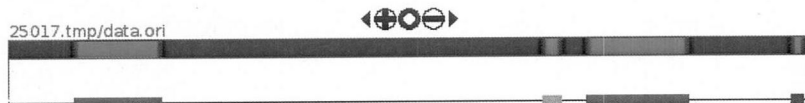
**Таблица 2**

Участки гомологии, выявленные в нуклеотидных последовательностях гена *pol* BLV с использованием программы Gini.

Класс, к которому принадлежат выявленные диспергированные повторы	Фрагменты	Длина
Транспозирующиеся элементы	4	707
ДНК транспозон	1	42
Эндогенные ретровирусы	2	602
ERV2	1	324
ERV3	1	278
LTR ретротранспозон	1	63
DIRS	1	63
Суммарно	4	707

Участки гомологии распределяются в следующем порядке в гене *pol*: 209 – 486 - ERV3-2\_CJa-I (66% гомологии, эндогенный ретровирус обезьяны); 1693 – 1755 DIRS-14\_DR (70% гомологии, ретротранспозон рыбы); 1833 – 2156 ERV2-4\_CPo-I (64% гомологии, эндогенный ретровирус морской свинки); 2481 – 2522 - DNA-2-26\_DR (79% гомологии, ДНК транспозон рыбы) (рис. 3).

Рисунок 3. Распределение участков гомологии по длине гена *pol* BLV к транспозонам рыбы (*zebrafish*) и млекопитающих – морской свинки (*guinea pig*) и обезьяны (*common marmoset*).



Примечание: Позиции гена *pol* 209 – 486 – участок ERV3-2\_CJa-I (66% гомологии); позиции 1693 – 1755 – фрагмент DIRS-14\_DR (70% гомологии); позиции 1833 – 2156 - фрагмент ERV2-4\_CPo-I (64% гомологии); позиции 2481 – 2522 – фрагмент DNA-2-26\_DR (79% гомологии).

На этом рисунке видно, что 3 из 4-х участков гомологии попадают в последовательности гена *pol*, в которых выявлено присутствие



неперекрывающихся последовательностей, потенциально высоко предрасположенных к формированию G4 квадруплекса (от позиции 1781 до позиции 2381). Полученные данные позволяют предполагать, что неперекрывающиеся последовательности, с относительно повышенной предрасположенностью к формированию G4 квадруплексов, могут отражать в большей степени рекомбинационные события, а варьирующие – нуклеотидный контекст, способствующий появлению новых мутаций.

Полученные данные позволяют предполагать, что относительно повышенная генетическая гетерогенность изолятов вируса бычьего лейкоза по гену *env* по сравнению с геном *pol* в определенной степени может быть обусловлена разной плотностью неканонических участков ДНК в провирусной ДНК. Повышенная плотность таких структур в генах, продукты которых непосредственно взаимодействуют с рецепторной системой клеток мишеней ретровирусов, могут способствовать их позитивной селекции, участвуя в генерации генетической гетерогенности, необходимой для конкурентных взаимоотношений в системе хозяин-патоген.

**3. Эмбриотрансплантации и связь геномной нестабильности коров-доноров с количеством получаемых от них эмбрионов.** В результате индукции суперовуляции и синхронизации охоты при стандартной схеме обработки коров-доноров, овуляция фолликулов затягивается по времени и спустя 7-8 суток после осеменения, при вымывании эмбрионов, определяются эмбрионы возраста 4-6 дней, которые не пригодны для дальнейшей трансплантации. Кроме этого фактора, отрицательно влияющего на качество эмбриопродуктивности коров-доноров, имеет место отрицательное влияние продолжительности индуцированной после гормональной обработки коров-доноров половой охоты и, соответственно, кратности искусственного осеменения на уровень оплодотворяемости яйцеклеток после суперовуляции (таблица 3).

Таблица 3

Оплодотворяемость яйцеклеток у коров-доноров в зависимости от продолжительности половой охоты и кратности осеменений

Группа	Продолжительность половой охоты, час	Кратность осеменений	Кол-во коров-доноров, (%)	Кол-во вымытых эмбрионов	Количество вымытых неоплодотворенных яйцеклеток, (%)
1 (контроль, n=20)	12	2	6(30)	50	16,7
	24	3	6(30)	78	9,8
	36	4	8(40)	70	26,1
2 (n=24)	12	2	7(29,2)	49	8,3
	24	3	10(41,6)	53	4,6
	36	4	7(29,2)	95	12,2
3 (n=22)	12	2	6(27,4)	34	14,1
	24	3	8 (36,3)	99	7,9
	36	4	8 (36,3)	103	18,3

Проведенные исследования показали, что у отдельных животных половая охота растягивалась на двое или трое суток и их осеменяли соответственно 3 и 4 раза с интервалом в 12 часов, в течение всего времени нахождения в состоянии охоты. Отмечено, что с увеличением продолжительности половой охоты увеличивается количество вымытых эмбрионов, что говорит об увеличении количества овуляций. Вместе с тем, оплодотворяемость яйцеклеток была наилучшей во 2-й группе коров-доноров (4,6% неоплодотворенных яйцеклеток) что гораздо ниже показателей в 1-й(контроль) группе 9,8% и 3-й группе 7,9%. Таким образом, у коров 2-й группы отмечен наибольший процент оплодотворяемости яйцеклеток в индуцированную охоту и наилучший показатель по синхронизации охоты по отношению к остальным группам коров-доноров. Изучение влияния продолжительности половой охоты (эффективность синхронизации) на стадию развития эмбрионов и их качество показало (таблица 3), что общее количество вымытых эмбрионов на разной стадии развития составило: в 1-й группе – 198; 2-й – 187; 3-й – 236. Из них общее количество пригодных для трансплантации эмбрионов по группам было: 1-я группа – 104 (52,5%); 2-я группа – 158 (84,5%); 3-я группа – 110 (46,6%). Таким образом,

общее количество эмбрионов пригодных для трансплантации из расчета на одного донора по группам составило: 1-я (контроль) группа –17,0; 2-я- 21,9; 3-я – 15,9.

Наилучшие результаты по получению пригодных эмбрионов в зависимости от продолжительности половой охоты отмечены при ее продолжительности (во всех группах) 24 часа. Вместе с тем количество эмбрионов пригодных для трансплантации (на одного донора) было наибольшим у животных 2-й группы – 21,9, что составляет 78,2%. Этот показатель превышает аналогичный в 1-й (контроль) группе на 24,0% и 3-й группе – на 29,4%. Сравнение качества полученных эмбрионов вымытых на 7-е сутки после оплодотворения во время индуцированной половой охоты показало, что количество морул и blastocyst было больше к этому времени у коров-доноров 2-й группы по отношению к 1-й (контроль) группе и к 3-й группе.

Для выяснения возможных взаимосвязей между количеством вымываемых эмбрионов и геномной стабильностью выполнен цитогенетический анализ клеток периферической крови коров-доноров. Для этой цели рассчитывали два типа анеуплоидии. Первый тип обозначали как AI, доля клеток с анеуплоидией общего типа среди всех встречающихся метафаз. Как правило, число хромосом в них колебалось у крупного рогатого скота от 53 до 67. Очевидно, что в изменчивость данной характеристики существенный вклад могут вносить особенности гипотонической обработки клеток и изменчивость стабильности их плазматических мембран. Ко второму типу анеуплоидии (AII) относили метафазы, в которых число хромосом было, в частности, у крупного рогатого скота или 59, или 61 (то есть  $2n \pm 1$ ). Предположительно этот тип анеуплоидии, приобретение либо утрата одной хромосомы, с относительно большей вероятностью может быть связан с нарушениями расхождения хромосом в митозе, чем при первом варианте анеуплоидии. Для того, чтобы оценить возможный вклад животных с относительно повышенной частотой встречаемости цитогенетических аномалий в клетках крови в следующее поколение, получаемое с использованием эмбриотрансплантаций, выполнено сравнение соматического мутагенеза у коров-доноров и количества вымываемых у них эмбрионов. В этих целях рассмотрены частоты встречаемости цитогенетических аномалий в клетках периферической крови у коров и количество получаемых от них эмбрионов, рассчитаны корреляционные взаимоотношения между разными

характеристиками дестабилизации кариотипа в периферической крови коров-доноров эмбрионов и количеством эмбрионов, которых вымыли у этих доноров (таблица 4).

**Таблица 4**

Корреляционные взаимоотношения между разными характеристиками дестабилизации кариотипа в периферической крови коров-доноров эмбрионов и количеством эмбрионов

Характеристики	Анеупл. I типа	Анеупл. II типа	Полн.	Ассоц.	Хр. аберр.	Асинхрон.	Эмбрионы
Анеупл. I типа	1.00						
Анеупл. II типа	-.39	1.00					
Полн.	-.23	.34	1.00				
Ассоц.	-.43	.45	.61	1.00			
Хр. аберр.	.37	-.29	-.38	-.58	1.00		
Асинхрон.	-.07	.09	.01	-.09	-.40	1.00	
Эмбрионы	-.15	-.24	-.43	-.31	.58	-.45	1.00

Оказалось, что между количеством эмбрионов и такой цитогенетической характеристикой, как частота встречаемости метафаз с хромосомными абберациями, существует статистически достоверная положительная корреляция ( $P < 0,05$ ). То есть, в популяцию вымытых эмбрионов наибольший вклад вносили эмбрионы, получаемые от коров-доноров, для которых была характерна повышенная частота встречаемости цитогенетических аномалий в метафазных пластинках клеток периферической крови. Таким образом, в результате выполненных исследований выявлена статистически достоверная корреляция между частотой встречаемости отдельных цитогенетических аномалий в клетках периферической крови у коров-доноров эмбрионов и количеством вымываемых у них эмбрионов. Полученные данные наглядно свидетельствуют о необходимости обязательного контроля при использовании биотехнологических процедур в целях предупреждения накопления генетических дефектов в стадах крупного рогатого скота.

**4. Эмбриональные стволовые клеточные популяции.** Для выделения эмбриональных стволовых клеток (ЭСК КРС) использовались восьми- и девятидневные (рис.4а) бластоцисты полученные путем дозревания и оплодотворения ооцитов *in vitro*. Выделение производили путем механического удаления трофобласта у вылупившихся или освобожденных от блестящей оболочки бластоцист (рис. 4б). После этого ВКМ (рис. 5) помещали в лунки 24-луночного планшета, содержащие фидерный слой клеток и ростовую среду DMEM с глутамином, заменимыми аминокислотами (MEM Non essential amino acids) и 10% FCS. Прикрепление ВКМ к фидерному слою происходило в течение 24-48 часов (рис.6). Кроме того, не наблюдалось прикрепление при помещении ВКМ в лунки, обработанные фибронектином и не содержащие фидерный слой.

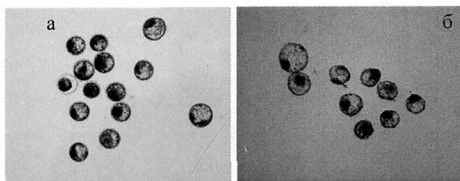


Рисунок 4. Бластоцисты КРС 9 суток: а - с блестящей оболочкой; б - без блестящей оболочки. Ув. об.х4, ок. 10

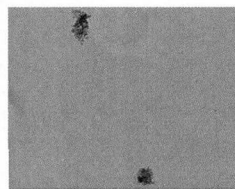


Рисунок 5. Разделение бластоцисты КРС на трофобласт (вверху) и клетки ВКМ (внизу). Ув. об.х4, ок. 10.

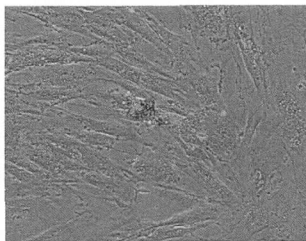


Рисунок 6. Клетки внутриклеточной массы КРС, высаженные на фидерный слой КРС на 2 сутки. Ув. об.х10, ок. 10.

Не смотря на характерную морфологию и способность сохраняться в течение 6-7 суток, наблюдалась постепенная деградация колоний. В ряде случаев ЭСК подобные клетки начинали выползать и распределяться по фидеру (рис. 7).

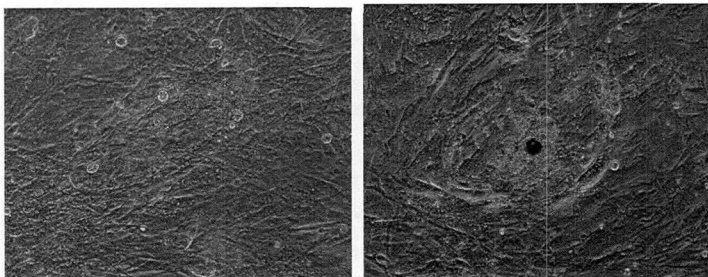


Рисунок 7. ЭСК КРС на 4 сутки после высаживания на фидерный слой КРС. Ув. об.х10, ок. 10.

При получении бластоцист после оплодотворения *in vitro* выявлены особенности поведения сперматозоидов по отношению к чужеродной ДНК, присутствующей в инкубационной среде. Это может объяснять известные неудачи использования сперматозоидов в качестве векторов трансгенных конструкций. Так описаны различия в эффективности трансфекции различных клеточных линий при помощи сочетания липосом с плазмидой. Не смотря на то, что выбранные в работе липосомы (Lipofectamine LTX with Plus Reagent, LifeTechnologies, США) обладают высоким уровнем трансфекции, могут применяться для трансфекции широкого ряда линий клеток включая первичные и сложно трансфицируемые (например, RAW264.7 macrophages) и использоваться в присутствии сыворотки, положительных результатов при использовании в качестве вспомогательной методики при спермий-опосредованной доставке экзогенной ДНК в ооцит КРС *in vitro* получено не было. В то же время, помимо полученных с помощью липофекции сперматозоидов кроликов (Wang et al., 2001; Al-Shuhaib et al., 2013) и кур (Rottmann et al., 1992; Harel-Markowitz et al., 2009), этот метод в сочетании с искусственным осеменением использовался для получения трансгенных телят (Shemesh et al., 2000).

При трансфекции, с использованием липосом, культуры фетальных фибробластов КРС получались стабильные положительные результаты (Рис.8).

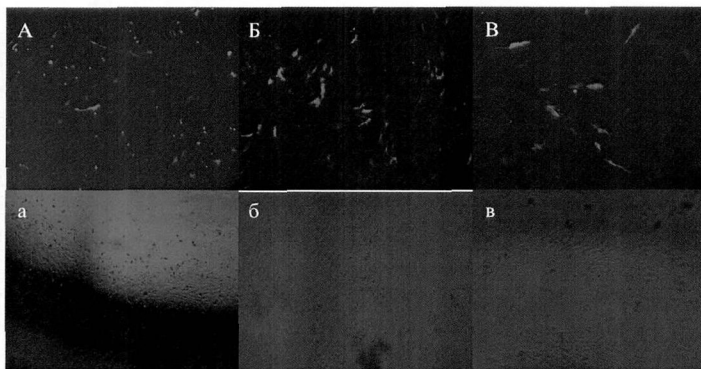


Рисунок 8. Результаты трансфекции фетальных фибробластов крупного рогатого скота (0,8 мкг плазмиды на лунку, содержащую 0,4 мл среды DMEM; подготовка комплексов ДНК в среде TF; соотношение ДНК/липофектамин – 1/2,5) в первый (А,а), четвертый (Б,б) и седьмой (В,в) день после трансфекции.

В то же время, ооциты в среду оплодотворения, содержащую сперматозоиды и комплексы ДНК-липосомы, помещались в составе комплексов ооцит-кумулюс. Таким образом, клетки кумулюса также инкубировались в присутствии комплексов ДНК-липосомы в течение 18–20 часов. Тем не менее, ни в первый день после оплодотворения, ни во время последующего культивирования у клеток кумулюса, как остающихся в планшете со средой оплодотворения, так и попадающих с зиготами в планшет культивирования, флуоресцентный сигнал белка EGFP обнаружен не был. Согласно литературным данным, клетки кумулюса трансфецируются хуже, чем фетальные фибробласты (Lee et al., 2005). Для выявления принципиальной возможности трансфекции клеток кумулюса при помощи комплексов, образованных из плазмиды pEGFP-N1 и Lipofectamine LTX в наших условиях, вначале был получен монослой путем культивирования в течение нескольких дней клеток кумулюса контрольной группы. После проведения трансфекции монослоя флуоресцентный сигнал белка EGFP в клетках кумулюса четко наблюдался (рис. 9).

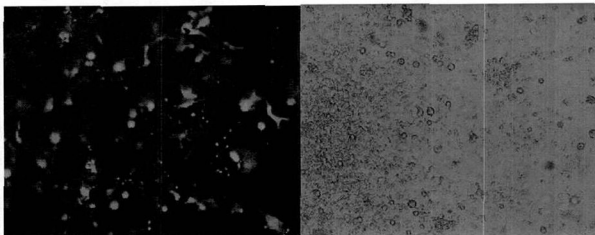


Рисунок 9 Результаты трансфекции монослоя клеток кумулюса (1 мкг плазмиды на лунку, содержащую 0,4 мл среды DMEM; подготовка комплексов ДНК в среде TF; соотношение ДНК/липофектамин LTX – 1/2,5) в первый день после трансфекции.

Таким образом, нами впервые выявлены отличия по успешности трансфекции плазмидой рEGFP-N1 ооцитов, фетальных фибробластов и клеток кумулюса, позволяющие предположить определенную агрессивность популяции сперматозоидов по отношению к ДНК плазмиды, используемых при оплодотворении ооцитов.

Учитывая трудности получения эмбриональных стволовых клеточных линий у крупных млекопитающих, выполнены исследования эпи- и генетической гетерогенности на модельных объектах – генеративных стволовых клеточных линиях мышей. Исследования выполнялись на двух моделях, представляющих популяции герминативных клеточных линий G1 и G4, полученных независимо друг от друга из половых бугорков 12,5 дневных эмбрионов мыши линии BALB/c и любезно предоставленных нам для цитогенетических исследований д.б.н., профессором Л.Л. Лукаш (Лукаш и др., 2005). В результате выполненных исследований получены следующие данные. В линии G4 условное модальное число хромосом (25,8%) представлено гипертриплоидным набором (64-66 хромосом), среди клеток присутствуют клетки с опережающей конденсацией хромосом, как правило, предшествующие многополосным митозам, выявлены метафазы с асинхронностью расхождения хроматид. Почти каждая метафаза содержала один или два хроматидных разрыва, (в среднем 1,23 разрыва на 1 метафазу), хромосомные разрывы встречались реже (в среднем 0,52 разрыва на 1 метафазную пластинку), однако обнаружился уникальный цитогенетический дефект – отрыв центромерных сегментов хромосом (в среднем 0,35 таких разрывов на 1 метафазу), (рис. 10).



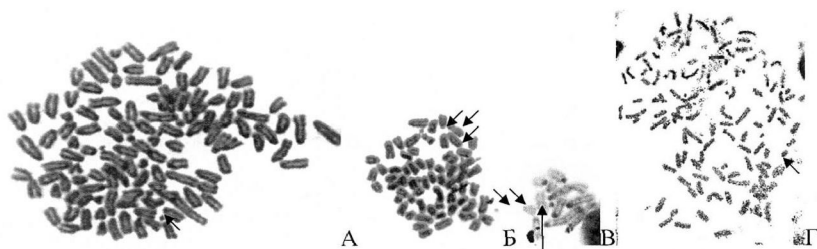


Рисунок 10. Герминативные стволовые клеточные линии G4 (А, Б, В) и G1 (Г), полученные из половых бугорков 12,5 дневных эмбрионов мышей линии BALB/c

Одной стрелкой указаны примеры утраченных центромерных сегментов хромосом, двумя – хромосом, лишенных центромерных сегментов, тремя – робертсоновских транслокаций с выраженной деспирализацией перичентромерных районов.

Практически в каждой метафазе выявлены центрические слияния хромосом по типу робертсоновских транслокаций (с частотой 0,94 транслокации на 1 метафазу). Кариотип G1 характеризовался гексаплоидным количеством хромосом (около 126 хромосом) с высокой частотой встречаемости центрических слияний (робертсоновских транслокаций) и выраженной эпигенетической гетерогенностью. В качестве эпигенетических характеристик рассматривались метафазы со спонтанной дифференциальной окрашиваемостью хромосом и метафазы с деспирализацией перичентромерных участков хромосом, связанной, по литературным данным, со сниженным метилированием этих участков в эмбриональных герминативных клетках грызунов (Bernardino-Sgherri J. et al., 2002). Цитогенетическая изменчивость клеток эмбриональной стволовой линии R1, полученной от мышей линии 129 с высокой предрасположенностью к спонтанным тератокарциномам тестикул, характеризовалась околодиплоидным количеством хромосом (37 – 42 хромосомы) с высокой частотой встречаемости центрических слияний (робертсоновских транслокаций), трисомией по хромосоме 8 и выраженной эпигенетической гетерогенностью. Выявленные особенности цитогенетической изменчивости R1 по количеству хромосом хорошо согласуются с описанными в литературе при исследовании субпопуляций этой же линии (D’Hulst C., 2013). В этой клеточной линии нами также была выявлена высокая частота центрических слияний по типу робертсоновских транслокаций, деспирализация перичентромерных участков, однако не наблюдались отрывы самих

центромерных сегментов, как в линиях G1 и G4. Полученные экспериментальные данные и накопленные в литературе свидетельства о том, что эмбриональные стволовые клеточные линии существенно отличаются друг от друга по предпочтительному типу геномной дестабилизации, которая сопровождается селекцией клеточных клонов в процессе пассирования клеточных популяций (Косовский, Глазко, 2012). Так, в клеточных популяциях R1, обнаруживается воспроизводимая трисомия либо хромосомы 11, либо хромосомы 8, без выраженной повышенной частоты хромосомных и хроматидных разрывов или полиплоидизации. Для герминативных клеточных линий G1 и G4 характерна полиплоидизация с повышенной частотой хроматидных разрывов, что свидетельствует о сниженном репаративном потенциале клеток в процессе репликации, а также утрата центромерных районов, способствующая постоянному изменению сочетаний копийности хромосом и, соответственно, генного баланса. Важно подчеркнуть, что для рассмотренных нами клеточных популяций одного и того же происхождения обнаруживается сходство предпочтительных типов мутирования.

Полученные данные свидетельствуют о том, что в эмбриональных стволовых клетках имеется множество источников поддержания генетической гетерогенности, в частности, полиплоидизация (в том числе и за счет межклеточных слияний), многополосные митозы, хромосомные транслокации, а также деспирализация перичентромерных районов хромосом, которая увеличивает вероятность центрических слияний и утрат центромерных районов. В эмбриональных стволовых клеточных линиях разного происхождения могут обнаруживаться разные варианты предпочтительных механизмов генерации генетической гетерогенности. В этой связи очевидно, что прогноз направления эволюции эмбриональных стволовых клеток в культуральных условиях и при их использовании в биотехнологических процедурах возможен только при создании каталога вариантов преобладающих типов генетической изменчивости, специфичных для таких клеток одного и того же происхождения. Такой каталог может позволить прогнозировать сохранение клетками плюрипотентности и вероятность их опухолевой трансформации.

**5. Мезенхимальные стволовые клетки.** Важной характеристикой, представляющей особый интерес для использования мезенхимальных стволовых клеток (МСК) при решении различных биотехнологических задач, является их повышенная устойчивость к различным генотоксическим воздействиям, в частности, к ионизирующему излучению, по сравнению с ЕС

клетками. Предполагается, что это свойство обусловлено устойчивостью клеточных популяций к гипоксии в результате их адаптации к гипоксическим условиям ниши локализации МСК в многоклеточном организме млекопитающих [Sokolov M. V., Neumann R. D., 2013]. Стволовые мезенхимальные клетки (МСК) впервые подробно были описаны в 1968 [Friedenstein A.J. et al., 1968.]. Однако до сих пор остаются неразвитыми методы их классификации. Для преодоления этой проблемы Международное общество по клеточной терапии (International Society of Cellular Therapy) ввело определение МСК, основанное на трех основных характеристиках: способность клеток адгезировать к пластиковому субстрату; экспрессия таких маркеров клеточной дифференцировки (CD) как CD73, CD90, и CD105, и отсутствие таких маркеров, как CD45, CD34, CD14, CD79 альфа или CD19 и HLA-DR; и наконец, МСК должны обладать способностью дифференцироваться в остеобласты, хондробласты и адипоциты *in vitro* в соответствующих условиях [Dominici, M. Et al., 2006]. Однако надежность экспрессии различных CD на плазматической мембране клеток до сих пор остается дискуссионным вопросом, который, по-видимому, обусловлен исходной гетерогенностью МСК в отношении потенциалов к клеточной дифференцировке в различных направлениях в пределах производных мезенхимального листа [Crisan M. Et al., 2008; Covas et al., 2008; Blocki A. Et al., 2013]. Таким образом, самыми надежными признаками, по которым клетки можно отнести к МСК, является их способность адгезировать к пластику и дифференцироваться в производные мезенхимального листа в соответствующих культуральных условиях.

В последние годы постоянно возрастает интерес к полимерным криогелям как к перспективным материалам для решения прикладных задач. Уникальная пористая структура криогелей оказывается полезной во многих случаях, особенно в качестве материалов биомедицинского и биотехнологического назначения. Уникальное сочетание высокой пористости и сообщающегося характера макропор, а также относительная простота технологии получения гелевых материалов с подобной морфологией позволяют рассматривать криогели как новый тип полимерных систем, интересных в научном и прикладном аспектах. Причем, как видно из рисунка поры в верхней части геля крупнее, чем в нижней, поэтому насланная клетки на разные поверхности можно добиться различных результатов (рис. 11).

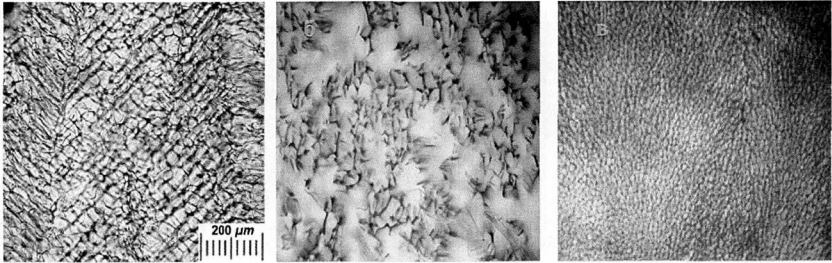


Рисунок 11. Желатиновый криогель. А – световая микроскопия без окраски; Б – окраска амидо-черным вид сверху; В – окраска амидо черным вид снизу.

При культивировании МСК в желатиновых криогелях было показано, что клетки активно заселяют его (рис. 12).

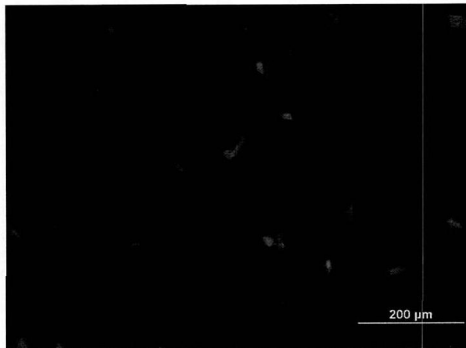


Рисунок 12. Желатиновый криогель, заполненный клетками МСК на 3 сут. культивирования. Прижизненная окраска кальцеином – видны светящиеся ядра клеток МСК. Ув. об.х20, ок. 10.

Полученные данные наглядно показывают, что в среде индуцирующей хондрогенез происходит синтез клетками сульфатированных гликозаминогликанов, окрашивающихся в синий цвет альциановым голубым и протеогликанов, окрашивающихся в красный цвет Сафранином О, что говорит о синтезе матрикса и направленной хондрогенной дифференцировке МСК (рис. 13).

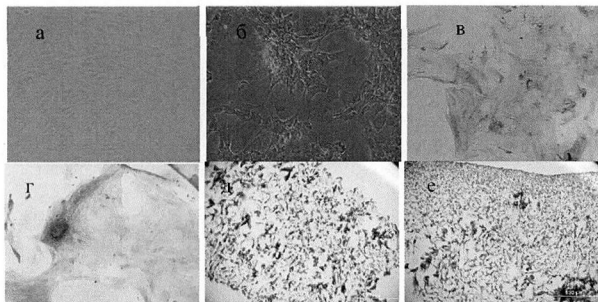


Рисунок 13. Клетки МСК КМ крыс: а) – в обычной среде на пластике на 10 сутки; б) – в хондрогенной среде на 10 сутки; в) - вышедшие из криогеля в обычной среде на 14 сутки; г) - после обработки в хондрогенной среде на 14 сутки; д) – в криогеле в обычной среде на 14 сутки; е) – в криогеле в хондрогенной среде на 14 сутки. Окраска альциановым голубым и сафранином О. Ув. об.х10, ок. 10.

При окраске фетальных фибробластов КРС не выражен синтез ГАГ и протеогликанов в среде, индуцирующей хондрогенную дифференцировку (рис.14).

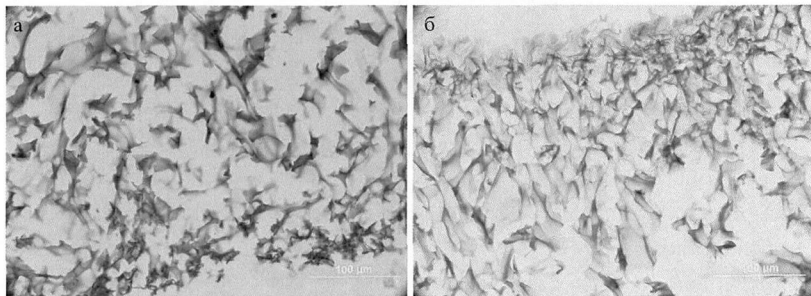


Рисунок 14. Желатиновые криогели, с иммобилизованными в них МСК КМ крыс: а - культивируемые в обычной среде; б - культивируемые в среде, индуцирующей хондрогенез. Окраска альциановым голубым и гематоксилином. Голубым окрашиваются ГАГ и гиалуроновая кислота. Ув. об.х40, ок. 10.

При культивировании на 3-мерном матриксе из желатинового криогеля наблюдается синтез сульфатированных гликозаминогликанов и гиалуроновой кислоты клетками в среде, индуцирующей хондрогенез, что говорит об их направленной дифференцировке в данных условиях и синтезе специфического для хондроцитов матрикса.

## Выводы

1. Разработан комплексный подход к отбору и подбору животных с желательным фенотипом с использованием методов геномного сканирования и усовершенствованы методы применения клеточных технологий для репродукции крупного рогатого скота.
2. Оценка полилокусного генотипирования фрагментов ДНК, фланкированных инвертированными повторами микросателлитных локусов позволяет надежно дифференцировать специализированные молочные от примитивных пород крупного рогатого скота.
3. Разработана оригинальная мультиплексная RT - PCR тест-система по двум консервативным участкам генов провирусной ДНК *gag* и *pol* с внутренним положительным контролем (*ablim2*, кодирующий белок, принадлежащий к семейству актин-связывающих белков) для выявления в геномах животных провирусной ДНК BLV.
4. С использованием методов биоинформатики впервые показана возможность прогноза наиболее полиморфных участков провирусного генома с учетом предрасположенности к формированию неканонических структур ДНК – маркеров геномной нестабильности (G4 квадруплексов).
5. Выявлена положительная статистически достоверная корреляция ( $r=0.58$ ) между частотой встречаемости отдельных цитогенетических аномалий в клетках периферической крови у коров-доноров и количеством полученных от них эмбрионов, что свидетельствует о необходимости цитогенетического контроля для предупреждения накопления генетического груза при эмбриотрансплантациях.
6. Разработаны и подобраны условия для получения первичных популяций эмбриональных стволовых клеток из бластоцист крупного рогатого скота, с целью дальнейшего их использования в биотехнологических процессах.
7. Получены экспериментальные данные свидетельствующие об индивидуальных особенностях мутационных спектров эмбриональных стволовых клеточных линий.
8. Разработаны методы выделения и пассирования мезенхимальных стромальных клеток, полученных из костного мозга и жировой ткани крупного рогатого скота.
9. Подобраны условия иммобилизации на 3-х мерных матриксах из желатиновых криогелей, позволяющие выделять мезенхимальные стволовые

клетки и индуцировать их дифференцировку в производные мезенхимального листка.

### **Практические рекомендации**

1. Результаты исследований могут использоваться в учебном процессе сельскохозяйственных вузов с целью углубления и расширения знаний студентов и слушателей о роли клеточных и геномных технологий в усовершенствовании живых сельскохозяйственных видов. Данные материалы вошли в учебные рабочие программы и используются в лекционных курсах и на практических занятиях по инновационным биотехнологиям для бакалавров, магистров и аспирантов зооинженерного факультета РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева.
2. Для практического использования предложены следующие методические, рекомендации, пособия и положения: «Методические рекомендации по подготовке проб спермы животных для использования в репродуктивных технологиях» 2009 г.; «Методические рекомендации по выделению и культивированию мезенхимных стволовых клеток (МСК) из костного мозга животных» 2009г.; «Методические рекомендации по выделению и культивированию мезенхимных стволовых клеток жировой ткани (МСКЖТ) животных» 2009 г.; Методическое пособие «Криоконсервация эмбрионов крупного рогатого скота для использования в репродуктивных технологиях» 2010 г.; Методическое пособие «Идентификация аллельных вариантов генов, влияющих на хозяйственно-полезные признаки *Sus scrofa* (свиньи домашней) 2010 г.; Методические положения «Генотипирование крупного рогатого скота по генам наследственных заболеваний» 2010 г.; Методические положения «Криоконсервация и хранение мезенхимных стволовых клеток» 2010 г.; «Методические положения по получению и культивированию эмбриональных стволовых клеток крупного рогатого скота в условиях *in vitro*, для их дальнейшего использования в биотехнологических процессах» 2013 г.; «Методические положения по культивированию и дифференцировке мезенхимных стволовых клеток иммобилизованных на 3-х мерных матриксах в хондроциты, для получения тканеинженерных

конструкций» 2013 г.; «Методические положения по витрификации полученных *in vitro* эмбрионов крупного рогатого скота для повышения выхода жизнеспособных эмбрионов после криоконсервации» 2013 г.; «Методические положения по применению метода доставки экзогенной ДНК в дозревшие *in vitro* ооциты крупного рогатого скота» 2013 г.; «Методические положения по применению мультиплексной RT-PCR тест-системы с внутренним положительным контролем для выявления провирусной ДНК вируса лейкоза крупного рогатого скота» 2013 г.; «Методические положения по использованию прибора КРОСС – 12 для определения фаз эстрального цикла, оптимального времени искусственного осеменения и диагностики ранней стельности» 2013 г. Заслушаны на секции «Ветеринарная биотехнология», утверждены академиком-секретарем А.М. Смирновым Отделения ветеринарной медицины Россельхозакадемии.

3. Для увеличения эффективности выявления инфицированных животных вирусом бычьего лейкоза рекомендуется использование разработанной оригинальной тест-системы амплификации фрагментов генов *gag*, *pol* и *ablim2*.
4. При разработках тест-систем для выявления интегрированных в геном хозяина провирусной ДНК ретровирусов рекомендуется учитывать нуклеотидные последовательности генома патогена, предрасположенные к формированию неканонических структур ДНК – маркеров двуцепочечных ДНК разрывов.
5. При использовании выполненных разработок для получения эмбриональных стволовых клеток крупного рогатого скота необходимо учитывать индивидуальные особенности мутационных спектров в клеточных популяциях разного происхождения.
6. Разработанная методика иммобилизации на 3-х мерных матриксах желатинового криогеля рекомендуется для выделения мезенхимных стволовых клеток из исходной гетерогенной популяции.



## СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

### Монографии:

Глазко В.И., Косовский Г.Ю., Глазко Т.Т. Введение в геномную селекцию животных. – М.: Изд-во ООО «ПРИЯТНАЯ КОМПАНИЯ». - 2012. -258 С.

### Статьи:

1. **Косовский Г.Ю.**, Каменев В.Ф Клинико - иммунологические аспекты при лечении пневмоний с использованием паравазальной лимфотропной иммунокоррекции.// *International Journal on Immunorehabilitation*. – November 2002.- V. 4. - N.2. - P. 269-270.
2. **Косовский Г.Ю.**, Славянская Т.А Оценка эффективности комбинированной лимфотропной иммунотерапии у больных внегоспитальной пневмонией на фоне базисной антибактериальной терапии.// *Аллергология и иммунология*.- Июнь 2003.- Т. 4. - N.2. - P. 51-53.
3. **Косовский Г.Ю.**, Каменев В.Ф, Славянская Т.А. Новый метод комбинированной иммунотропной терапии больных пневмонией.// *Аллергология и иммунология*.- Июнь 2003.- Т. 4. - N.2. - P. 95-96.
4. Глазко Т.Т., Дубицкий С.Е., **Косовский Г.Ю.** Частоты встречаемости цитогенетических аномалий в клетках крови крупного рогатого скота разных направлений продуктивности при действии низких доз ионизирующего излучения // *Сельскохозяйственная биология*.- 2007. - № 6. - С. 58-62.
5. Гринаковская О.С., Андреева Е.Р., Буравкова Л.Б., Рылова Ю.В., **Косовский Г.Ю.** Пониженное содержание  $O_2$  замедляет коммитирование культивируемых мезенхимальных стромальных клеток-предшественников из жировой ткани в ответ на остеогенные стимулы.// *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. - 2009. - Т. 147. - № 6. - С. 704-707.
6. Grinakovskaya O.S., Andreeva E.R., Buravkova L.B., Rylova Y.V., **Kosovsky G.Y.** Low level of  $O_2$  inhibits commitment of cultured mesenchymal stromal precursor cells from the adipose tissue in response to osteogenic stimuli.// *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. - 2009. - Т. 147. - № 6. - P. 760-763.
7. Степанов О.И., Быкова М.В., **Косовский Г.Ю.** Подготовка ооцитов крупного рогатого скота для *in vitro* манипуляций. // *Животноводство России*. - 2010. - № 11. - С. 58-60.

8. Самохин А.С., **Косовский Г.Ю.**, Панкратова А.В. Мастит как причина задержки возобновления нормоциклической активности яичников после отела у коров молочных пород // Проблемы биологии продуктивных животных. - 2011. - №4. - С.124-126.
9. **Косовский Г.Ю.**, Панкратова А.В., Самохин А.С. Маститы и репродуктивная активность коров // Проблемы биологии продуктивных животных. - 2011. - №4. - С.63-65.
10. Панкратова А.В., **Косовский Г.Ю.**, Самохин А.С. Динамика фолликулогенеза у молочных коров // Проблемы биологии продуктивных животных. - 2011. - №4. - С.97-100.
11. **Косовский Г.Ю.**, Краснов М.С., Назимкина С.Ф., Панкратова А.В. Биотехнологические подходы к повышению реализации генетического потенциала высокопродуктивных коров. // Проблемы биологии продуктивных животных. - 2011. - № 2. - С. 11-15.
12. Роговая О.С., Краснов М.С., Косовская Е.В., **Косовский Г.Ю.** Мезенхимные стволовые клетки как иммуносупрессоры в клеточной терапии // Сельскохозяйственная биология. Серия «Биология животных». - 2011. - №2. - С.15-20.
13. Глазко Т.Т., **Косовский Г.Ю.**, Глазко В.И. Геномная нестабильность и контроль коров доноров эмбрионов. // Аспекты репродуктивной биотехнологии. Выпуск 1. – М.: Изд-во ООО «ПРИЯТНАЯ КОМПАНИЯ», 2012. - С.136-143.
14. Глазко Т.Т., **Косовский Г.Ю.**, Глазко В.И. Взаимосвязь между геномными характеристиками и молочной продуктивностью у КРС. // Аспекты репродуктивной биотехнологии. Выпуск 1. – М.: Изд-во ООО «ПРИЯТНАЯ КОМПАНИЯ», 2012. - С. 123-135.
15. Сотникова Е.А., **Косовский Г.Ю.**, Глазко В.И. Оптимизация методов диагностики носительства вируса бычьего лейкоза. // Аспекты репродуктивной биотехнологии. Выпуск 1. – М.: Изд-во ООО «ПРИЯТНАЯ КОМПАНИЯ», 2012. - С. 87-97.
16. Глазко В.И., **Косовский Г.Ю.** Некоторые вопросы соматического клонирования млекопитающих. // Аспекты репродуктивной биотехнологии. Выпуск 1. – М.: Изд-во ООО «ПРИЯТНАЯ КОМПАНИЯ», 2012. - С. 35-62.
17. **Косовский Г.Ю.**, Глазко Т.Т. Полипотентные стволовые клетки и их генетическая гетерогенность. // Аспекты репродуктивной биотехнологии.

- Выпуск 1. – М.: Изд-во ООО «ПРИЯТНАЯ КОМПАНИЯ», 2012. - С. 24-35.
- 18.Климов Е.А., **Косовский Г.Ю.** К вопросу о возможности заражения человека вирусом лейкоза крупного рогатого скота. // Ветеринарная медицина. -2012. - №2. - С.9-10.
  - 19.Насибов Ф.Н., Панкратова А.В., Самохин А.С., Хетагурова Б.Т., **Косовский Г.Ю.**, Хилькевич С.Н., Белоконова Д.А. Эндометральные нарушения у коров и их нормализация препаратом эндотил-форте. // Сельскохозяйственная биология. - 2012. - № 2. - С. 60-63.
  - 20.Trang Xuan Toan,Vu Chi Cuong, Tong Huu Hien, Luuquang Minh, Pham Thi Phuong Mai, **Косовский Г.Ю.**, Глазко В.И., Giang Thi Than Nhan, Loung Nhan Tuan and Tran Xuan Hoan. Phylogenetic relationship of the H5N1 viruses isolated in Vietnam, 2012 based on sequencing analyses of HA and NA gene segments. //Интеграл.- 2013. - №4(72). -С. 4-8.
  - 21.**Косовский Г.Ю.**, Сотникова Е.А., Мудрик Н.Н., Cuong V.C., Toan T.X., Hoan T.X., Глазко В.И. Диагностика лейкоза КРС с помощью праймеров к генам gag и pol. // Ветеринария. - 2013. - № 8. - С. 58-61.
  - 22.Глазко В.И., **Косовский Г.Ю.** Структура генов, кодирующих оболочечные белки ретровирусов птичьего гриппа и бычьего лейкоза. // Доклады Российской академии сельскохозяйственных наук. - 2013. - № 5. - С. 56-60.
  - 23.Глазко Т.Т., **Косовский Г.Ю.**, Глазко В.И. Биомаркеры геномной нестабильности у животных сельскохозяйственных видов. // Известия Тимирязевской сельскохозяйственной академии. - 2013. - № 2. - С. 139-147.
  - 24.Корниенко Е.В., **Косовский Г.Ю.**, Глазко В.И. Проблемы клонирования сельскохозяйственных животных. // Сельскохозяйственная биология. – 2014. - №2. С. 32-38
  - 25.**Косовский Г.Ю.** Неканонические мотивы ДНК (G4 квадруплексы) в генах провирусной ДНК ретровирусов птичьего гриппа и бычьего лейкоза. // Вестник Российской академии сельскохозяйственных наук. – 2014. - №2. С. 41-46

#### Патенты:

1. Патент РФ на изобретение № RU 2222353 С2 от 11.03.2001г. «Способ паравазального лимфотропного введения лекарственных препаратов» **Косовский Г.Ю.**, Каменев В.Ф., Косовский Ю.А. – Опубликовано 27.06.2003 г.

2. Патент РФ на изобретение № RU 2203064 С2 от 11.03.2001г. «Способ лечения аспириновой бронхиальной астмы» **Косовский Г.Ю.**, Каменев В.Ф. – Опубликовано 27.04.2003 г.
3. Патент РФ на изобретение № RU 2218166 С2 от 11.03.2001г. «Способ лечения демиелинизирующих заболеваний» **Косовский Г.Ю.**, Каменев В.Ф., Губарев Ю.Д. – Опубликовано 10.12.2003 г.
4. Положительное решение о выдаче патента на полезную модель № 2012149909/10(079908) от 23.11.2012г. «Аппарат для синтеза полинуклеотидов» **Косовский Г.Ю.**, Горбунова Е.А.

#### **Методические рекомендации:**

**Косовский Г.Ю.**, Мельничук С.Д., Краснов М.С., Михайлова М.Е., Спиридонов В.Г., Климов Е.А., Волчок Н.М., Бояринцева И.С., Камыш Н.А., Коновал О.Н. Методические рекомендации по идентификации аллельных вариантов генов, влияющих на хозяйственно-полезные признаки *Sus scrofa* (свиньи домашней). – М.: Изд-во «Россельхозакадемия». - 2011. -32 С.

#### **Материалы конференций:**

1. **Косовский Г.Ю.**, Каменев В.Ф., Клишевичус В.Л. Оценка эффективности лимфотропной иммунокорректирующей терапии у больных бронхиальной астмой. // Материалы 12 национального конгресса по болезням органов дыхания. – Москва. - 2002. – С.56.
2. **Косовский Г.Ю.**, Каменев В.Ф. Сравнительный анализ клинико - иммунологических показателей при различных методах иммунокорректирующей терапии у больных пневмонией. // Материалы 12 национального конгресса по болезням органов дыхания. – Москва. - 2002. – С.222.
3. **Косовский Г.Ю.**, Каменев В.Ф. Иммунная регуляция системы фибринолиза у больных пневмониями. // Научные ведомости. – Белгород: Издательство БелГУ. – 2002. -№1(16). – С.63-64.
4. **Косовский Г.Ю.**, Каменев В.Ф. Роль макрофагально-моноцитарного звена в регуляции гемостаза у больных пневмониями. // Материалы II межрегиональной научно-практической конференции. – Елец, 2002. – С.59-61.
5. **Косовский Г.Ю.**, Каменев В.Ф. Клиническая эффективность иммунокоррекции при лечении пневмоний. // International Journal on Immunorehabilitation. – March 2002.- V. 4. - N.1.-P. 68.
6. **Косовский Г.Ю.** Значение иммунокоррекции при лечении больных пневмониями в педиатрической практике. // Вопросы педиатрии: Сб.

- науч. тр., посвященных 70-летию педиатрического факультета. – Воронеж: Центрально-Черноземное книжное издательство. – 2003. – С.55-56.
7. **Косовский Г.Ю.**, Славянская Т.А Иммунореабилитация больных пневмонией с различной степенью тяжести патологического процесса // *International Journal on Immunorehabilitation*. – Октябрь 2003.- V. 5. - N.2.- P. 224.
  8. **Косовский Г.Ю.**, Славянская Т.А Иммунный статус больных пневмонией и новый эффективный метод иммунотерапии. // *International Journal on Immunorehabilitation*. – Октябрь 2003.- V. 5. - N.2.-P. 223.
  9. **Косовский Г.Ю.**, Славянская Т.А. Эффективность паравазальной лимфотропной иммунотерапии при лечении пневмоний. // *International Journal on Immunorehabilitation*. – May 2003.- V. 5. - N.1.-P. 59.
  10. **Т.Славянская, G.Kosovsky, Y.Sepiashvili** Phenotypic characteristics of immunocompetent cells in blood of patients with pneumonia and new effective method of immunotherapy. // *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. - 2004. -Vol 113 - N 2S. - P. S128.
  11. **Т.Славянская, G.Y.Kosovsky, R.Sepiashvili** Phenotypic characteristics of immunocompetent cells in the blood of patients with pneumonia. // *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. - 2004. -Vol 113 - N 2S. - P. S128
  12. **Косовский Г.Ю.**, Косовская Е.А., Славянская Т.А. Влияние лимфотропной иммунокорректирующей терапии на клеточной звено иммунитета у больных с сочетанным течением пневмонии и сахарного диабета. // *International Journal on Immunorehabilitation*. – 2004.- V. 6. - N.1.-P. 160.
  13. **Косовский Г.Ю.**, Славянская Т.А., Сепиашвили Р.И. Тактика комплексной иммунореабилитации больных с тяжелой формой пневмонии. // *International Journal on Immunorehabilitation*. – 2004.- V. 6. - N.1.-P. 67.
  14. **Косовский Г.Ю.**, Буеверова Э.И. Подходы к выделению субпопуляций моноклональных мезенхимных стволовых клеток (МСК), основанные на их различной avidности к белкам экстрацеллюлярного матрикса (ЭМ) in vitro. // *Биология стволовых клеток: фундаментальные аспекты*. – Москва. – 2005. – С.38-39.
  15. **Косовский Г.Ю.** Новые подходы к лечению дегенеративных заболеваний и травм соединительных тканей с использованием

- аутологичных мезенхимных стволовых клеток костного мозга. // Биология стволовых клеток: фундаментальные аспекты. – Москва. – 2005. – С.36-37.
16. **Косовский Г.Ю.**, Дубицкий С.Е., Глазко Т.Т. Мутационные спектры в клетках крови коров разных пород. // Международная научная конференция "Наследие Н.И. Вавилова - фундамент развития отечественного и мирового сельского хозяйства".-М.- ноябрь 2007. С. 167-168.
17. **Косовский Г.Ю.**, Котенко К.В., Бушманов А.Ю., Кретов А.С. Способ лечения местных лучевых поражений с использованием клеточных технологий. // I научно-практическая конференция по профпатологии «Актуальные вопросы профпатологии».г. Северодвинск. – 2007. С. 86-87.
18. **Косовский Г.Ю.**, Котенко К.В., Бушманов А.Ю., Надежина Н.М. Новая инновационная технология лечения местных лучевых поражений // IV Международная научно-практическая конференция. Томск. Апрель 2007. С. 59.
19. **Kosovsky G.Y.**, Kotenko K.V., Nadezhina N.M., Kretov A.S., Kretova E.J. Opportunity of use of cellular technologies for replacement of skin defects at the patient with local radiation injuries. // IRPA regional congress for Central and Eastern Europe. – Romania. - 2007. – P. T1-O1.
20. **Kosovsky G.Y.**, Bushmanov A.J., Kotenko K.V., Nadezhina N.M., Kretov A.S., Kretova E.J., Kosovskaya E.V. Application of cellular technologies for replacement of skin defects at the patient with local radiation injuries. // IRPA regional congress for Central and Eastern Europe. - Romania, 2007. –P. T1-O1.
21. **Косовский Г.Ю.**, Котенко К.В., Бушманов А.Ю., Надежина Н.М. Возможность применения клеточных технологий в лечении и реабилитации больных с местными лучевыми поражениями (МЛП). // IV Международная научно-практическая конференция. Томск. Апрель 2007. - С. 115-116.
22. **Косовский Г.Ю.**, Быкова М.В. Глутатион и глутатионзависимые ферменты в сперматозоидах и семенной плазме мужчин и быков при патоспермии // Тезисы Российско-китайской научно-практической конференции «Диагностика и профилактика инфекционных болезней животных». 10-13 июля 2009.- Харбин. – С.57. .
23. **Косовский Г.Ю.**, Краснов М.С. Мезенхимные стволовые клетки в лечении лучевых поражений и ожогов у сельскохозяйственных животных и человека // Тезисы Российско-китайской научно-практической

- конференции «Диагностика и профилактика инфекционных болезней животных». 10-13 июля 2009. – Харбин. – С.58.
24. Самуйленко А.Я., Раевский А.А., **Косовский Г.Ю.**, Боро И.Л., Еремец В.И., Гринь С.А., Федоров Ю.Н., Ломакина Т.А. Основные направления научной деятельности ГНУ «Всероссийский научно-исследовательский и технологический институт биологической промышленности» Россельхозакадемии (ВНИТИБП). // Международная конференция SPASE-2009 / РОССИЯ – ФРАНЦИЯ : двустороннее сотрудничество в развитии АПК. – 12-17 сентября 2009. – С. 86-89.
25. Быкова М.В., **Косовский Г.Ю.**, Светлаков А.В. Нарушения редокс-баланса в сперматозоидах и семенной плазме мужчин при астенозооспермии // В сборнике Материалы международной научно-практической конференции, посвященной 40-летию ВНИТИБП РАСХН «Научные основы производства ветеринарных биологических препаратов» (9-10 декабря 2009 г.), Щелково. - С. 607-609.
26. **Косовский Г.Ю.**, Быкова М.В., Краснов М.С., Долгова О.С., Косовская Е.В. Разработка метода разделения по полу сперматозоидов животных // В сборнике: Материалы международной научно-практической конференции, посвященной 40-летию ВНИТИБП РАСХН «Научные основы производства ветеринарных биологических препаратов» (9-10 декабря 2009 г.), Щелково. - С. 596-600.
27. Долгова О.С., Краснов М.С., **Косовский Г.Ю.** Получение и биологическая характеристика мультипотентных мезенхимных стромальных клеток жировой ткани и возможность их применения в ветеринарной медицине // В сборнике: Материалы международной научно-практической конференции, посвященной 40-летию ВНИТИБП РАСХН «Научные основы производства ветеринарных биологических препаратов» (9-10 декабря 2009 г.), Щелково. - С. 594-596.
28. **Косовский Г.Ю.**, Краснов М.С., Быкова М.В., Степанов О.И. Клонирование в животноводстве // В сборнике: Материалы международной научно-практической конференции, посвященной 40-летию ВНИТИБП РАСХН «Научные основы производства ветеринарных биологических препаратов» (9-10 декабря 2009 г.), Щелково. - С. 589-593.
29. Нестерова А.П., Головатенко-Абрамов П.К., Климов Е.А., **Косовский Г.Ю.** Метод, повышающий эффективность получения трансгенных животных // Сборник тезисов 2-го Международного Конгресса-

- Партнеринга и Выставки по биотехнологии и биоэнергетике, 13-15 апреля 2010. – Москва. - С. 134-135.
30. **Косовский Г.Ю.**, Краснов М.С., Климов Е.А., Косовская Е.В., Нестеров И.И. Комплексная репродуктивная биотехнология, как механизм решения проблем воспроизводства стада в животноводстве // Сборник работ молодых ученых II-Международной научно-практической конференции «Молодые ученые в решении актуальных проблем в науке». Владикавказ. - 2011. - Ч.1. - С.402-404.
31. **Косовский Г.Ю.**, Колмычкова К.И., Футочкина В.А. Информационно-вычислительные технологии в решении прикладных научных задач в агропромышленном комплексе (АПК). // ИВТН-2012:/12.11.2012 С. 6-7.
32. Панкратова А.В., Насибов Ф.И., **Косовский Г.Ю.** Стимулирование овариальной цикличности в послеродовой период // III международная научно-практическая конференция «Молодые ученые в решении актуальных проблем науки». Владикавказ. - 2012. - С.318-321.
33. Насибов Ф.И., **Косовский Г.Ю.**, Панкратова А.В. Значение и перспективы репродуктивных биотехнологий в скотоводстве // III международная научно-практическая конференция «Молодые ученые в решении актуальных проблем науки». Владикавказ. - 2012. - С.310-312.
34. **Косовский Г.Ю.**, Панкратова А.В., Насибов Ф.И. Механизм регуляции репродуктивных функций коров и телок // III международная научно-практическая конференция «Молодые ученые в решении актуальных проблем науки». Владикавказ. - 2012. - С.297-300.
35. Горбунова Е.А., **Косовский Г.Ю.** Биофизика и оптика: моделирование геномной информации. // Материалы V международной заочной научно-практической конференции "Научная дискуссия: вопросы физики, химии, биологии", Москва. - 2012. - С.46-51.
36. **Косовский Г.Ю.**, Горбунова Е.А. Разработка оптического метода моделирования молекулярных структур полипептидов. // Материалы международной научно-практической конференции "Научные основы производства и обеспечения качества биологических препаратов для АПК", 5-7 декабря 2012 г., Щелково – 2012 - С.288-289.
37. **Косовский Г.Ю.**, Горбунова Е.А., Колмычкова К.И., Футочкина В.А., Спиридонов А.В. Оценка цитотоксичности органических экстрактов на рост культуры крысиных мезенхимальных стволовых клеток, полученных из костного мозга и постнатальных фибробластов человека. // Материалы международной научно-практической конференции "Научные основы



- производства и обеспечения качества биологических препаратов для АПК", 5-7 декабря 2012 г., Щелково-2012. - С.295-296.
38. **Косовский Г.Ю.**, Горбунова Е.А., Колмычкова К.И., Фучочкина В.А., Спиридонов А.В. Экзогенное электромагнитное поле как фактор ориентации мезенхимальных стволовых клеток в трехмерных матриксах // Материалы международной научно-практической конференции "Научные основы производства и обеспечения качества биологических препаратов для АПК", 5-7 декабря 2012 г., Щелково-2012. - С.293-294.
39. **Косовский Г.Ю.** Генетична паспортизація племінних і високопродуктивних тварин з використанням інноваційних технологій – (Устный доклад) / 2-4 жовтня, V Международная научно-практическая конференция « Ветеринарніпрепарати: Розробка, контроль якості та застосування» 2013 року Львів
40. **Косовский Г.Ю.** «Генетическая паспортизация племенных и высокопродуктивных животных с использованием инновационных технологий» Доклад// Первый Южно-Российский международный ветеринарный конгресс, г. Ростов-на-Дону 26-27.09.2013.
41. Горбунова Е.М., Люсова Л.Р., Толстов А.М., Ржавскова В.Б., Колмычкова К.И., Косовская Е.В., **Косовский Г.Ю.** Сравнительный анализ адгезивных свойств эластомерных материалов. // ПМеждународная научно- практическая конференция: «Новейшие достижения биотехнологии». 24-25 жовтня 2013. – Киев. - С. 36-37.
42. Коробкова М.Ю., Корниенко Е.В., Черненко Е.Ю., Нестеров И.И., **Косовский Г.Ю.**, Маленко Г.П. Оптимизация условий оплодотворения дозревших *in vitro* ооцитов крупного рогатого скота. // В Сборнике материалов III Международной научно-практической конференции "Сельскохозяйственные науки и агропромышленный комплекс на рубеже веков" (СХ-3), Новосибирск, 27 сентября 2013. - С.33-39.
43. **Косовский Г.Ю.**, Спиридонов А.В. Программно-автоматизированные системы анализа геномов - как фактор интенсификации геномной селекции сельскохозяйственных животных. // Материалы VII Всероссийской научно-практической конференции молодых ученых "Наука и устойчивое развитие", Нальчик, 2013. - С. 74.
44. **Косовский Г.Ю.**, Сотникова Е.А. Сравнительная оценка разработанной тест-системы для диагностики провирусной ДНК вируса лейкоза крупного рогатого скота (ВЛКРС). // Материалы VII Всероссийской

- научно-практической конференции молодых ученых "Наука и устойчивое развитие", Нальчик. – 2013. - С.73.
45. **Косовский Г.Ю.**, Горбунова Е.А., Колмычкова К.И., Спиридонов А.В., Фуюточкина В.А. Оценка влияния органичных экстрактов по параметру цитоксичности на рост культуры мезенхимальных стволовых клеток, полученных из костного мозга крысы (МСК КМ) и постанатальных фибробластов человека (ПФЧ). // Материалы VII Всероссийской научно-практической конференции молодых ученых "Наука и устойчивое развитие", Нальчик. – 2013. - С. 72.
46. **Косовский Г.Ю.**, Горбунова Е.А. Метод моделирования молекулярных структур полипептидов Материалы VII Всероссийской научно-практической конференции молодых ученых "Наука и устойчивое развитие", Нальчик. – 2013. - С. 71
47. **Косовский Г.Ю.**, Горбунова Е.А. Колмычкова К.И., Фуюточкина В.А., Спиридонов А.В. Информационно-вычислительные технологии в агропромышленном комплексе (АПК). // В сб. Материалы VII Всероссийской научно-практической конференции молодых ученых «Наука и устойчивое развитие», Нальчик. – 2013. – С. 71.
48. **Афанасьев В.М.**, Горбунова Е.А., Колмычкова К.И., Фуюточкина В.А., **Косовский Г.Ю.** Изучение трансфекции стволовых клеток, полученных из клеточной суспензии костного мозга крыс линии W1STAR, фибробластов человека и крупного рогатого скота. // В сб. Материалы VII Всероссийской научно-практической конференции молодых ученых «Наука и устойчивое развитие», Нальчик. – 2013.- С. 8.
49. Фуюточкина В.А., Колмычкова К.И., **Косовский Г.Ю.** Влияние органичных экстрактов на культуры постнатальных фибробластов человека. // II конференция участников российского биомаркерного консорциума "БИОМАРКЕРЫ 2013" 19 февраля 2013. – Москва. - С. 37-38.
50. Сотникова Е.А., **Косовский Г.Ю.** Биомаркеры ретровирусной инфекции на примере вируса бычьего лейкоза // II конференция участников российского биомаркерного консорциума "БИОМАРКЕРЫ 2013" 19 февраля 2013. – Москва. - С. 35-36.
51. Корниенко Е.В., **Косовский Г.Ю.** Биомаркеры эмбриональных стволовых клеток. // II конференция участников российского биомаркерного консорциума "БИОМАРКЕРЫ 2013" 19 февраля 2013. – Москва. - С. 26-27.

52. **Косовский Г.Ю.**, Горбунова Е.А., Колмычкова К.И., Спиридонов А.В., Фуюточкина В.А. Сравнительный анализ эффективности коммерческих реагентов для трансфекции различных клеточных линий. // Материалы VII Московского международного конгресса "БИОТЕХНОЛОГИЯ: СОСТОЯНИЕ И ПЕРСПЕКТИВЫ РАЗВИТИЯ" 19-22 марта 2013. - С. 142.
53. **Косовский Г.Ю.**, Горбунова Е.А., Колмычкова К.И., Спиридонов А.В., Фуюточкина В.А. Выявление цитотоксического влияния аутологичных органных экстрактов на рост культуры мезенхимальных стволовых клеток крысы (МСК КМ ). // Материалы VII Московского международного конгресса "БИОТЕХНОЛОГИЯ: СОСТОЯНИЕ И ПЕРСПЕКТИВЫ РАЗВИТИЯ" 19-22 марта 2013. - С. 132.
54. **Косовский Г.Ю.**, Колмычкова К.И., Фуюточкина В.А. Нормы морали и нормы права в биотехнологии: отношение государств мира к клонированию человека. // Материалы VII Московского международного конгресса "БИОТЕХНОЛОГИЯ: СОСТОЯНИЕ И ПЕРСПЕКТИВЫ РАЗВИТИЯ" 19-22 марта 2013. - С. 24.
55. **Косовский Г.Ю.** Клеточные и генные технологии в интенсификации животноводства. // Материалы VII Московского международного конгресса "БИОТЕХНОЛОГИЯ: СОСТОЯНИЕ И ПЕРСПЕКТИВЫ РАЗВИТИЯ" 19-22 марта 2013. - С. 443-444.
56. **Косовский Г.Ю.**, Сотникова Е.А. ПЦР тест-система для детекции провирусной ДНК вируса лейкоза крупного рогатого скота. // Материалы VII Московского международного конгресса "БИОТЕХНОЛОГИЯ: СОСТОЯНИЕ И ПЕРСПЕКТИВЫ РАЗВИТИЯ" 19-22 марта 2013. - С. 462.
57. Горбунова Е.М., Шульгина Е.Н., Люсова Л.Р., Колмычкова К.И., **Косовский Г.Ю.**, Косовская Е.В. Метод проверки на цитотоксичность полимерных материалов медицинского назначения invitro. // Сборник статей по материалам XXV международной научно-практической конференции №9(22). - Октябрь 2013. – Новосибирск. - С. 22.

4

Подписано в печать 24.02.2014г.

Усл.п.л. – 1.5  
Заказ №19450  
Тираж: 110 экз.

Копицентр «ЧЕРТЕЖ.ру»  
ИНН 7701723201  
107023, Москва, ул.Б.Семеновская 11, стр.12  
(495) 542-7389  
[www.chertez.ru](http://www.chertez.ru)