

**МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ**

**МИКОЛАЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ АГРАРНИЙ УНІВЕРСИТЕТ**

**Факультет технології виробництва і переробки продукції тваринництва,  
стандартизації та біотехнології**

**Кафедра ветеринарної медицини та гігієни**

## **БІОТЕХНОЛОГІЯ РЕПРОДУКЦІЇ ОРГАНІЗМІВ**

### **Курс лекцій**

для здобувачів першого (бакалаврського) рівня вищої освіти ОПП  
«Біотехнології та біоінженерія» спеціальності 162 «Біотехнології та  
біоінженерія» денної форми здобуття вищої освіти

**Миколаїв  
2023**

УДК 606:636.082  
Б63

Друкується за рішенням науково-методичної комісії факультету ТВППТСБ Миколаївського національного аграрного університету від 19 квітня 2023 р., протокол № 9.

Укладачі:

Лумедзе І. Х. – канд. вет. наук, доцент, завідувач кафедри ветеринарної медицини та гігієни Миколаївського національного аграрного університету.

Посухін В. О. – асистент кафедри ветеринарної медицини та гігієни Миколаївського національного аграрного університету.

Рецензенти:

Калиниченко Г. І. – кандидат с.-г. наук, доцент, голова науково-методичної комісії факультету кафедри технології виробництва продукції тваринництва Миколаївського національного аграрного університету.

## ЗМІСТ

Лекція № 1 «Вступна лекція, введення в дисципліну».....	4
Лекція № 2 «Біотехнологічні способи регуляції відтворної функції тварин».	15
Лекція № 3 «Трансплантація ембріонів».....	23
Лекція № 4 «Технологія роботи з ембріонами».....	38
Лекція № 5 «Зберігання ембріонів та статевих клітин».....	44
Лекція № 6 «Отримання ембріонів in vitro».....	49
Лекція № 7 «Клонування ембріонів тварин».....	59
Лекція № 8 «Способи одержання химер. Регуляція та способи визначення статі».....	69

## Лекція № 1 «Вступна лекція, введення в дисципліну»

План:

1. Значення "Біотехнології" та її місце серед інших зооветеринарних наук.
2. Історія розвитку біотехнології.
3. Стан, напрямки та перспективи розвитку біотехнології в тваринництві.
4. Основні розділи біотехнології, методи вивчення.

### **1. Значення "Біотехнології" та її місце серед інших зооветеринарних наук.**

Сучасне визначення біотехнології – це промислове використання біологічних процесів і агентів для одержання вискоефективних форм мікроорганізмів, культур клітин і тканин рослин та тварин із заданими властивостями.

Біотехнологія – міждисциплінарна галузь науково-технічного прогресу. Вона досить гетерогенна за своєю теоретичною основою, оскільки досліджує не який-небудь клас об'єктів, а вирішує певне коло комплексних проблем. Питання, до вирішення яких залучають біотехнологічні розробки, досить різноманітні. Однак більшість з них прямо чи опосередковано пов'язані з глобальними проблемами, що стоять перед сучасною цивілізацією. До них відноситься забруднення навколишнього середовища, загроза екологічної кризи, виснаження запасів корисних копалин (у першу чергу джерел енергії), загроза світової енергетичної кризи, нестача продовольства.

Основними цілями біотехнології можна вважати такі:

- можливість точної діагностики, профілактики та лікування інфекційних і генетичних захворювань;
- створення мікроорганізмів, що продукують різні хімічні сполуки, антибіотики, полімери, амінокислоти, ферменти;
- створення порід сільськогосподарських та інших тварин, спадкові властивості яких поліпшено;

- значне збільшення врожайності сільськогосподарських культур шляхом створення рослин стійких до шкідників, грибкових та вірусних інфекцій і шкідливого впливу навколишнього середовища;
- переробка викидів, що забруднюють навколишнє середовище.

Біотехнологія використовує досягнення багатьох галузей науки та створює широкий асортимент продуктів і методів.

## **2. Історія розвитку біотехнології.**

Наука формується та еволюціонує відповідно до формування і розвитку людства. Це безпосередньо стосується і біотехнології. Питання про формування біотехнології трактується неоднозначно. На думку одних учених (Овчинников Ю.А., Баєв А.А., Скрябін Г.К.), правомірно віднести до сфери біотехнології класичні процеси бродіння, включаючи одержання спирту, силосування. На думку інших (Аїба С., Хемфрі А.Е., Милліс Н.Ф.), умовною датою появи біотехнології можна вважати присудження компанії «Мерк Кемикал Компани» премії Мак-Гро-Хілла за досягнення в області біохімічної технології в 1947 р. Також існує думка, що початок біотехнології варто віднести до 70-х років ХХ ст., з моменту зародження генетичної інженерії. Отже, правомірно віднести виникнення сучасної біотехнології, яка розпочала формуватися на базі існуючих галузей мікробіологічної промисловості, до початку 50-х років минулого століття, а весь попередній етап, що розпочався з найдавніших цивілізацій, називати передісторією формування біотехнології.

Передісторію формування біотехнології має ряд етапів. Це емпіричний, етіологічний (зародження природничих наук у XV–XVII століттях; формування мікробіологічних виробництв і початок взаємодії науки й мікробіологічних виробництв наприкінці ХІХ – 10-х роках ХХ ст., що викликало революційне перетворення мікробіологічних виробництв). Наступний – біотехнічний (створення науково-технічних передумов для

виникнення сучасної біотехнології 10–50-й роки XX ст.), і геннотехнічний – ера новітніх біотехнологічних процесів.

**Емпіричний** (від грец. *empeirikos* – дослідний) або доісторичний період – найбільш тривалий, охоплює близько 8000 років, з яких більш ніж 6000 років – до нашої ери і біля 2000 років – наша ера. Стародавні народи того часу інтуїтивно використовували засоби і способи виготовлення хліба, пива та інших продуктів, які в наш час ми відносимо до розряду біотехнологічних.

Шумери – перші мешканці Месопотамії (на території сучасного Іраку) створили розвинену в ті часи цивілізацію. Вони випікали хліб з кислого тіста, володіли мистецтвом готувати пиво. В цьому їм наслідували асирійці і вавилоняни, які також мешкали в Месопотамії, єгиптяни і стародавні індуси. До того ж емпіричного періоду належить: одержання кисломолочних продуктів, квашеної капусти, медових алкогольних напоїв, силосування кормів, квашення луб'яноволоконних рослин.

З найдавніших часів людство стикалося з негативними наслідками діяльності мікроорганізмів (псування продуктів, інфекційні хвороби людей і домашньої худоби). На перших етапах це були неусвідомлені, емпіричні спроби розробки методів і засобів боротьби з цими явищами. Так стали виникати методи консервування продуктів.

Таким чином, народи з давніх-давен користувалися на практиці мікробіологічними процесами, нічого не знаючи про мікроби. Емпіризм також був характерний і в практиці застосування корисних рослин і тварин.

**Етіологічний** (від грец. *aitia* – причина) період формування біотехнології розпочався у другій половині XV ст. із розвитку сучасного природознавства. На становлення біології істотний вплив мали успіхи в хімії, яка із описової в цей період перетворюється на аналітичну. Відбулися зрушення у вивченні сутності процесів бродіння; виник термін ферментація, а процес бродіння стали пов'язувати з наявністю в середовищі дріжджів або ферментів. У XVI–XVII століттях спочатку в Франції, а потім повсюдно для

розпушення тіста стали використовувати пивні дріжджі; пізніше зі зміною й удосконалюванням технології пивоваріння для цих цілей почали застосовувати дріжджі спиртового виробництва. У другій половині XVIII ст. було доведено здатність однієї речовини розкладати інші. Це стало початком експериментального вивчення унікальної здатності ферментів до каталізу специфічних хімічних реакцій.

У цей період відкрили багато органічних кислот, гліцерин, холестерин, глюкозу, перші амінокислоти, здійснили синтез сечовини. Для зародження ензимології велике значення мало вивчення процесу гідролізу полісахаридів. Значний вплив на створення наукових основ мікробіологічних виробництв мали роботи Луї Пастера, який на прохання уряду Франції досліджував причини порушення технологічних процесів на виробництвах.

Велике значення мали роботи з вивчення мікробного антагонізму й застосуванню його в медицині. І.І. Мечниковим було створено вчення про антагонізм мікробів і науково-обґрунтовані рекомендації для азотфіксації

Таким чином, розвиток описової мікробіології й вивчення хімічних перетворень стали важливою передумовою для становлення мікробіології й біохімії. В XIX ст. з розвитком хімічних наук було закладено основи органічної хімії.

**Біотехнічний** останній період ери передісторії сучасних біотехнологій (10–50-ті роки XX ст.) умовно можна розділити на два етапи. На початку першого етапу, в основному, відбувалося вдосконалення технології існуючих виробництв, а потім, завдяки успіхам у мікробіології, біохімії й інших науках того періоду, внаслідок принципових удосконалень апаратури і технологій виникла основа для організації нових виробництв. У цей період почали випускати нові екологічно чисті біодобрива і біологічні препарати для боротьби зі шкідниками та хворобами сільськогосподарських рослин, створилися виробництва ряду цільових продуктів (органічних розчинників, спиртів), розпочалися промислові випробування біотехнологічних процесів переробки та використання рослинних відходів.

Другий етап даного періоду тісно пов'язаний із біотехнологічними методами одержання ряду складних речовин – антибіотиків, ферментів, вітамінів. Революційним моментом даного періоду була промислова реалізація технології виробництва антибіотиків. Відправною точкою при цьому стало відкриття О. Флемінгом, Х. Флорі й Е. Чейном хіміотерапевтичної дії пеніциліну. Практично одночасно в Радянському Союзі З.В. Єрмольєва, вивчаючи дію лізоциму, показала, що він є чинником природного імунітету.

Накопичені наукові факти стали спонукальним мотивом для розробки способів великомасштабного культивування клітин різного походження. Це було необхідно для одержання клітинних продуктів і самих клітин для потреб людини, і, насамперед, як лікувальних або профілактичних засоби: пеніциліну, стрептоміцину, тетрациклінів, декстрину, ряду амінокислот і багатьох інших речовин. До 1950 р. Ж. Моно (Франція) розробив теоретичні основи безперервного керованого культивування мікробів.

**Геннотехнічний** (від грец. genesis – походження, виникнення, народження) – ера новітніх біотехнологічних процесів, що розвивається протягом останніх 35–40 років, пов'язана з використанням іммобілізованих ферментів і клітинних органел, а також заснована на методах рекомбінантних ДНК. Наприкінці 60-х років іммобілізовані ферменти і клітини стали успішно застосовуватися не тільки для виробництва напівсинтетичних препаратів, а й для проведення нескладних біохімічних аналізів.

Бурхливо розвиваються в цей час генетична й клітинна інженерія, це сприяє тому, що біотехнологія поступово охоплює все нові й нові галузі виробництва, які рішуче впроваджуються в багатьох сферах діяльності людини.

Впровадження новітніх методів біотехнології наразі сприяють перевероту у різних напрямках біотехнології. Ці методи дозволяють інтенсифікувати екологічно чисті біотехнології відтворення їжі та кормових препаратів, вирішувати завдання забезпечення людства матеріальними і



енергетичними ресурсами, а також природоохоронні проблеми. Всі ці досягнення поставили біотехнологію на новий рівень, що якісно відрізняється від попереднього можливістю свідомо керувати клітинними процесами.

### **3. Стан, напрямки та перспективи розвитку біотехнології в тваринництві.**

Нині завдяки успіхам у фундаментальних науках виникла можливість розвитку принципово нових ефективних методів впливу на організм тварин та їх спадковість.

Головні розділи біотехнології у тваринництві – генетична та клітинна інженерія. Методи генетичної інженерії, що найбільш детально розроблені на мікроорганізмах, забезпечують можливість спрямованої зміни їх генотипу. На відміну від спонтанних мутацій ці зміни можна заздалегідь планувати. Так, у мікроорганізми зовсім виразно вбудовують гени, що відповідають за синтез інтерферону, соматотропіну, деяких незамінних амінокислот. Можливості подальшого розвитку цього напрямку величезні. Ведуться дослідження і розробки з виділення та клонування певних генів, їх вбудовування в геном. Якщо генетична інженерія в мікробіології стала реальністю та набуває більш практичного значення, то для тварин застосування цих методів тільки починається. Однак встановлено, що можливо виділити певні гени з генома тварин і вбудувати їх у геном іншої особини. Виникає перспективне завдання – використати свійських тварин як живих реакторів, ферментерів для виробництва найцінніших біологічно активних речовин.

Однак, існуючі методи введення в геном тварин чужорідного генетичного матеріалу ще недостатньо досконалі і ступінь імовірності вбудовування цих генів і їх експресії невеликий та обчислюється декількома відсотками. Тому особливе значення для розвитку генно-інженерних робіт у тваринництві набуває відпрацювання методів вилучення з яєчників,

культивування і запліднення дозрілих ооцитів *in vitro* з наступним їх розвитком та трансплантацією самкам. Поєднання цих двох методів створює оптимальні умови для широкого впровадження генної інженерії в практику селекційно-плеємної роботи у тваринництві. Ймовірно, що у найближчій перспективі методами генетичної інженерії будуть створені нові форми сільськогосподарських тварин.

Розширення можливостей генної інженерії пов'язано із відкриттями в процесах регулювання дії генів. Мікрохірургія на яйцеклітинах та ембріонах і рекомбінація ДНК у принципі надають можливість більш інтенсивної селекції тварин. Сполучення генетичного маніпулювання із уже широко розповсюдженими методами тривалого зберігання сперми та ембріонів дає селекціонеру небачені можливості значно ефективнішої селекції.

Разом із тим, у цієї системи, що ґрунтується на методах генетики популяцій, є обмеження через пошук бугаїв-поліпшувачів на підставі оцінки за їх нащадками серед великої кількості тварин.

Поряд із розвитком методів генетичної інженерії у тваринництві перспективними є способи клітинної інженерії.

Уже накопичено великий досвід культивування соматичних клітин тварин *in vitro*, розроблено оптимальні середовища та режими культивування, відпрацьовано способи тривалого зберігання клітин за низьких температур. Розробка цих методів створює міцну основу для розгортання теоретичних і прикладних робіт із клітинної інженерії сільськогосподарських тварин, які матимуть все зростаюче народногосподарське значення.

На перше місце варто поставити вже досить добре розроблений метод поділу раних ембріонів. З розвитком трансплантації в руках дослідників з'явилася достатня кількість раних ембріонів, що дало потужний імпульс роботам з маніпуляції цими об'єктами.

Один з методів клітинної інженерії – трансплантація раних ембріонів, одержання ідентичних близнюків, химерних тварин. Ці методи вже широко

впроваджуються в практику селекції сільськогосподарських тварин і прискорюють генетичне поліпшення порід.

Генетична й клітинна інженерія широко використовуються у ветеринарії. Значні втрати за відтворення худоби й птиці пов'язані з різними захворюваннями. Особливо великий збиток наносять інфекційні захворювання. Для боротьби з рядом хвороб успішно застосовують різні вакцини. Методами генної інженерії можливо створити такі вакцини, які не вдається одержати традиційними методами. Ці вакцини можуть бути більш безпечними, дешевими й стабільними порівняно з існуючими.

Для одержання рекомбінантних продуктів використовують бактерії, гриби і все частіше клітини тварин. Це дозволяє одержувати штучним шляхом білки, що в нормі продукуються тільки тваринами. Потрібні гени були перенесені у відповідні організми, в яких і виявляли експресію.

Наразі дослідження спрямовані на створення системи ферментів для одержання глюкози із целюлози. Гени, що контролюють виділення ферментів, які знайдені в грибах, що ростуть повільно, були клоновані та перенесені в бактерії і дріжджі, які швидко ростуть. Це дозволило створити ефективну технологію одержання із целюлози деревини легкоперетравних вуглеводів. Проводяться роботи з одержання ферментів, що беруть участь у гідролізі лігніну, що дозволяє створити технологію його розщеплення на більш прості молекули. Це надалі дасть можливість одержувати біогаз або одноклітинний протеїн, що забезпечить розроблення технології обробки грубих, целюлозовмісних кормів.

Для вирішення проблеми повноцінної годівлі тварин за участю рекомбінантних мікроорганізмів проводиться промисловий синтез білків і амінокислот, збагачення рослинних кормів мікробним білком. Перспективним шляхом у цьому напрямі вважається створення штамів, які сприяють більш ефективному силосуванню сільськогосподарських культур, що містять багато крохмалю (наприклад, люцерна). Ще однією можливістю

забезпечити жуйних білками є спрямована модифікація мікроорганізмів, що існують у рубці.

Утилізація відходів тваринницьких комплексів і виробництв із переробки продукції тваринництва також здійснюється за допомогою біотехнологічних мікробіальних процесів, для вдосконалення яких та збільшення інтенсивності треба, в першу чергу, поліпшити властивості мікроорганізмів за рахунок модифікації їх генів, або створення рекомбінантних бактерій.

Однак, поряд з перевагами, які можливо отримати при використанні досягнень біотехнології, слід згадати і про наслідки, що можуть бути викликані бурхливим розвитком нової галузі. Тому виникає необхідність відповіді на запитання:

- Чи не будуть організми, що створені методами генної інженерії небезпечно впливати на інші живі організми або на навколишнє середовище?
- Чи не викличе створення і розповсюдження генетично модифікованих організмів зменшення природного генетичного різноманіття?
- Чи необхідно патентувати тварин, що виведені генно-інженерними методами?
- Чи не зазнає шкоди традиційне сільське господарство від використання досягнень біотехнології?

#### **4. Основні розділи біотехнології, методи вивчення.**

Залежно від призначення та методів, що використовуються, розрізняють такі розділи біотехнології:

##### **Мікробна технологія.**

**Призначення:** Мікробіологічний синтез продуктів, придатних для виробництва біомаси, утилізація різних речовин та матеріалів – нафти, вугілля, металу, целюлози, пластмаси.

**Матеріал, методи, обладнання:** Клітини мікроорганізмів, відходи.

**Метод перенесення генетичної інформації:** Ріст і розмноження мікробних клітин.

**Галузі виробництва, продукти:** Виробництво антибіотиків, кормового білка, ферментів, амінокислот, дріжджів.

#### **Клітинна інженерія.**

**Призначення:** Гібридизація соматичних клітин, перенесення ядер клітин, об'єднання ембріонів.

**Матеріал, методи, обладнання:** Методи культури та гібридизації соматичних тканин.

**Метод перенесення генетичної інформації:** Гібридизація соматичних клітин, перенесення ядер клітин.

**Галузі виробництва, продукти:** Одержання гібридів для виробництва моноклональних антитіл, соматична гібридизація.

#### **Генна (молекулярна) інженерія.**

**Призначення:** Конструювання біохімічними методами молекул ДНК, ізоляція та синтез генів, перенесення генів у клітину.

**Матеріал, методи, обладнання:** Ферменти рестриктази, лігази, зворотної транскриптази.

**Метод перенесення генетичної інформації:** Рекомбінація, трансформація, трансдукція, трансгенез, клонування генів.

**Галузі виробництва, продукти :** Синтез чужорідного білка в клітині, одержання гормонів, лікарських препаратів.

#### **Геномна (хромосомна) інженерія.**

**Призначення:** Зміна кількості хромосом у геномі, створення нових ліній, форм, синтез штучних хромосом.

**Матеріал, методи, обладнання:** Гібридологічний аналіз, прямі та зворотні схрещування, одержання поліплоїдів.

**Метод перенесення генетичної інформації:** Генетичні, цитологічні методи заміщення хромосом та збільшення їх кількості.

**Галузі виробництва, продукти :** Виділення окремих хромосом, віддалене схрещування, одержання транслокацій та делецій.

#### **Ембріональна інженерія.**

**Призначення:** Вирощування організмів *in vitro*, одержання клонів високопродуктивних організмів, створення особин з новими властивостями, розмноження вихідного селекційного матеріалу.

**Матеріал, методи, обладнання:** Пересадка органів і тканин, трансплантація ембріонів, створення гібридів.

**Метод перенесення генетичної інформації:** Хірургічні методи, культура тканин, методи кріоконсервації.

**Галузі виробництва, продукти:** Одержання тварин трансплантантів з метою формування високопродуктивних стад.

#### **Інженерна ензимологія.**

**Призначення:** Синтез і модифікація органічних сполук, біоконверсія рослинної сировини, використання іммобілізованих ферментів.

**Матеріал, методи, обладнання:** Штами мікроорганізмів, ферменти імуноферментний аналіз.

**Метод перенесення генетичної інформації:** Методи іммобілізації ферментів, створення нових штамів.

**Галузі виробництва, продукти:** Переробка молока та м'яса, відходів харчової промисловості, створення нових джерел енергії.

## **Лекція № 2 «Біотехнологічні способи регуляції відтворної функції тварин»**

План:

1. Статевий цикл та його видові особливості у с.-г. самок.
2. Нейрогуморальна регуляція статевого циклу.
3. Гормональні препарати та схеми їх використання.
4. Морфофункціональні зміни в організмі самок під впливом гормонів.
5. Стимуляція відтворної функції самок. Синхронізація статевої охоти у тварин.

### **1. Статевий цикл та його видові особливості у с.-г. самок.**

Статева функція самок характеризується вираженою періодичністю, тобто має циклічний характер. Комплекс фізіологічних і морфологічних змін, що відбуваються в статевій системі і в організмі самки від однієї овуляції до наступної, називають статевим циклом. Це — складний, нейрогуморальний ланцюговий рефлексорний процес, який розвивається поступово й спрямований на створення в організмі самки сприятливих умов для запліднення та розвитку зародка.

**Тічка** — морфологічні зміни в геніталіях — активна гіперемія, проліферація, набрякання слизових оболонок, активна секреція залоз переддвер'я піхви, шийки матки, розкриття шийки матки та виділення тічкового слизу в піхву і назовні.

**Загальне збудження самки (загальна реакція)** — проявляється неспокійним станом її, відмовою від корму, іноді агресивністю, зниженням молочної продуктивності та погіршенням якості молока.

**Охота (статева охота)** — позитивна сексуальна реакція самки на самця. Вона прагне наблизитися до нього, стає в позу для статевого акту, часто виділяє сечу, дає змогу самцеві зробити садку.

**Овуляція** — вихід яйцеклітини з фолікула.

При визначенні описаних стадій статевого циклу враховують: зміни загального стану тварин, який може бути збудженим, спокійним, зрівноваженим; реакцію самки на самця, яка буває позитивною, негативною, байдужою; наявність тічкових змін у піхві та матці; наявність дозрілих фолікулів, овуляцію, жовті тіла.

Середня тривалість статевого циклу (тобто інтервал від однієї овуляції до наступної у невагітних тварин) становить: у корів 18-22 доби (у середньому 21), у кобил 20-21, у свині 20-21, у вівці 14-19 (частіше 16-17) діб.

Виявляють тічку та охоту у тварин спостереженням за їх поведінкою та оглядом статевих органів. Звичайно у них спочатку з'являється тічка, потім збудження, охота й нарешті овуляція.

Зовнішньо тічка проявляється набряканням та почервонінням статевих губ, волоски біля нижнього кута статевої щілини бувають вологими. На нижній поверхні кореня хвоста, на сідничих горбах можна побачити слиз, що виділився із статевої щілини. Частіше помітити виділення слизу можна вранці, коли тварина лежить на підлозі чи на підстилці — під коренем хвоста можна побачити невелику калюжку слизу.

## **2. Нейрогуморальна регуляція статевого циклу.**

Характерні для статевого циклу специфічні зміни в статевій системі самок, їх поведінці, як і в організмі в цілому, періодично повторюються протягом усього репродуктивного життя самки аж до клімактеричного періоду. Вони пов'язані насамперед із змінами гормонального співвідношення в гіпоталамо-гіпофізарно-яєчниковому ланцюзі, ростом у яєчниках фолікулів і дозріванням у них статевих клітин, овуляцією, утворенням і зворотним розвитком жовтих тіл.

Зміна процесів збудження та гальмування і надходження у кров підвищених концентрацій гонадотропних та статевих гормонів викликає



появу у самок ознак статевого циклу: тічки, загального збудження (загальна реакція), охоти, дозрівання фолікулів та овуляцію.

А. П. Студенцов, надаючи важливого значення нервовій регуляції статевої функції, виділив у статевому циклі три стадії — збудження, гальмування і зрівноваження, а К. Братанов, віддаючи перевагу гуморальній регуляції, виділив у ньому дві стадії — фолікулінову (дозрівання фолікула) і лютеїнову (жовтого тіла чи прогестеронову).

Лютеїнова стадія характеризується зниженням ознак тічки, інволюцією (зворотним розвитком) морфологічних і фізіологічних процесів, характерних для попередньої стадії. Самка заспокоюється, у неї поліпшуються апетит і продуктивність, вона негативно чи байдуже реагує на самця; у яєчнику, на місці фолікула, що овулював, утворюється жовте тіло, яке виробляє гормон прогестерон.

### **3. Гормональні препарати та схеми їх використання.**

Для гормональної обробки корів використовують в основному два типи гонадотропнів – ліофілізований гонадотропін сироватки жеребних кобил (ГСЖК) і фолікулостимулюючий гормон (ФСГ), який найчастіше одержують із гіпофізу свиней. ГСЖК одержують із сироватки крові кобил у період від 40-го до 100-го дня жеребності. У цей період у крові кобил присутні високі концентрації гонадотропнів. У перший місяць жеребності виявлено високу гонадотропну активність гіпофізу і недостатню активність жовтого тіла, а трохи пізніше в матці утворюються ендометріальні чаші – тимчасові ендокринні залози, які секретують і виділяють у кров гонадотропіни, що викликають ріст і розвиток великих фолікулів. Після овуляції на їх місці утворюються жовті тіла, що виділяють додаткові кількості прогестерону.

Співвідношення ФСГ і ЛГ (лютеїнізуючий гормон) в ГСЖК впливає на ефективність суперстимуляції. Наприклад, за співвідношення ФСГ:ЛГ 1,3:1,0 ін'єкція ГСЖК коровам викликає дозрівання приблизно 6 фолікулів і овуляцію 4 яйцеклітин. Застосовується і комплексний препарат ФСГ і ЛГ (співвідношення 5:1), результати такої стимуляції значно ефективніші за

рівнем суперовуляції. ГСЖК має тривалий (до 5 діб) період напіврозпаду в організмі тварини, тому перевагою його використання є виконання лише однієї ін'єкції для появи суперовуляції. Це дозволяє знизити витрати праці і зменшити стресову дію на тварин. Активність ГСЖК позначається в інтернаціональних (ІЕ, ІU) або мишиних (м.е., m.u.) одиницях дії. Одна ІЕ еквівалентна близько 2,33...2,43 м.е. Звичайна доза ГСЖК, що вводиться одноразово внутрішньом'язово, становить 2500...3000 ІЕ. Але недолік застосування ГСЖК пов'язаний з тим, що великі його дози можуть викликати кісти яєчників. Кіста яєчника являє собою порожнину із серозним або слизистим вмістом і утворюється із фолікулів, які не розірвалися в результаті переродження і скупчення в них рідини. Такі кісти називають фолікулярними. Причини виникнення кіст в яєчниках пов'язані з невідповідним годуванням, відсутністю моціону, запальними процесами в матці та ін. Кіста яєчника порушує його функцію і тому виникають перегули. Кісти при лікуванні можна роздавлювати пальцями, масажуючи яєчники через пряму кишку. Проте кісти часто після роздавлювання регенерують і тому їх доводиться роздавлювати кілька разів.

ГСЖК вводять на 8...13 день циклу, найкраще на 10...12 день, тобто в середині циклу, коли найбільш висока активність жовтого тіла яєчника для упередження передчасної овуляції через утворення великої кількості естрогену в дозріваючих фолікулах. Простагландин F2 $\alpha$  вводять внутрішньом'язово дозою 500 мкг (2 мл препарату Естрофан – лютеолітичний аналог простагландину) за 48 годин після введення ГСЖК. Охота у корів настає за 48 годин після введення Естрофану.

Недоліком застосування ГСЖК є важкість підбору точної дози цього препарату. За введення підвищених доз може відбутися кістозне переродження яєчників. Крім того, введення ГСЖК часто призводить до прояву небажаних імунних реакцій, які супроводжуються утворенням антитіл. У цьому разі повторні обробки ГСЖК безрезультатні протягом 60 днів через тривалу дію ГСЖК. Для нейтралізації надлишків сироваткового

гонадотропіну, підвищення заплідненості яйцеклітин і якості ембріонів рекомендують застосовувати антисироватку до ГСЖК. Її вводять внутрішньом'язово через 24 години після початку прояву охоти і після другого осіменіння дозою 1...2 мл залежно від кількості ГСЖК, для забезпечення нейтралізації не менше однієї третини вживаної дози ГСЖК. Більш раннє введення антисироватки призводить до зниження реакції яєчників на ГСЖК у корів-донорів.

ФСГ одержують із гіпофізу тварин, найчастіше свиней. ФСГ має нетривалий період напіврозпаду (до 6 год.). Тому його вводять в організм протягом 4...5 днів уранці і увечері з інтервалом між ін'єкціями 12 год. Введення препаратів ФСГ разом з простагландином F<sub>2α</sub> має переваги перед ГСЖК. По-перше, він забезпечує більший вихід повноцінних ембріонів. ФСГ також знижує відмінності в результатах реакції яєчників окремих корів, дає стабільніші результати. На відміну від ГСЖК за використання ФСГ методику обробки можна стандартизувати (у разі застосування ГСЖК співвідношення в ньому ФСГ і ЛГ коливається залежно від серії). Крім того, препарати ФСГ, на відміну від ГСЖК, не викликають імунної реакції та вироблення антитіл і не спричиняють кістозних змін в яєчниках. Добре зарекомендували себе препарати «ФСГ-П» («FSH-P», США), «Фолікотропін» (Spofa, Чехія), «ФСГ-супер» (м. Боровськ, Росія).

Застосовують різні схеми введення ФСГ. Найбільшого поширення набули схеми з щоденним зменшенням кількості введеного препарату (хоча застосовуються схеми і з однаковою кількістю гормону), при загальній дозі від 32 до 50 мг ФСГ. Ін'єкції ФСГ починають на 8...10 день естрального циклу. Кращі результати одержують за введення ФСГ, починаючи з 10 дня циклу.

ФСГ вводять внутрішньом'язово в область крижів. Залишок розведеного ФСГ заморожують і зберігають до наступної обробки.

Допускається лише одноразове заморожування. Зберігання розчиненого ФСГ в холодильнику за температури +5о С допускається в межах 12 годин, після чого його активність знижується.

Недоліком ФСГ є необхідність багатократних ін'єкцій. У зв'язку з цим розроблявся спеціальний препарат Пролонгон, який продовжував би дію ФСГ і зробив можливим його одноразову ін'єкцію. Проте, цей препарат поступається за своєю ефективністю багатократному введенню ФСГ і не набув широкого розповсюдження в практиці трансплантації.

#### **4. Морфофункціональні зміни в організмі самок під впливом гормонів**

Жовте тіло, виділяючи гормон прогестерон, гальмує дозрівання нових фолікулів і сприяє імплантації зиготи та заглибленню ворсинок судинної оболонки в слизову оболонку матки. Цим створюються умови для розвитку зародка. Після завершення формування плаценти, розвиток плода надалі залежить від неї, і функція жовтого тіла послаблюється.

Секреторна діяльність жовтого тіла і плаценти відбивається на функції інших ендокринних залоз, а отже, і на обміні речовин.

Під час вагітності щитовидна залоза збільшується в розмірі і підвищується її функція. Таке ж явище відбувається і в передній частці гіпофіза, де спостерігається збільшення за рахунок основних клітин залози. Морфологічні зміни спостерігаються під час вагітності і в інших залозах внутрішньої секреції – в надниркових і підшлунковій.

У тварини після запліднення змінюється обмін речовин і появляється добрий апетит, що сприяє кращій їх вгодованості. Це видно з того, що шерстний покрив стає гладким і блискучим, форми тіла округляються і повніють. У другій половині вагітності, незважаючи на те, що апетит зберігається, тварина марніє, бо вона не встигає асимілювати достатню кількість поживних речовин, потрібну для себе, і для плода, який швидко розвивається. Через це відбувається витрачання резервів, пластичних

речовин, зібраних протягом першої половини вагітності. Це чергування доброї вгодованості і похудання наочно відбивається на рості копитаць та рогів тварини. Потовщення на рогах (“кільце”) з’являється у вагітних тварин у першій половині вагітності, а поява кільцевих жолобків – в другій половині вагітності (по кільцях визначають, скільки було отелень у корови).

### **5. Стимуляція відтворної функції самок. Синхронізація статевої охоти у тварин.**

Застосування синтетичних аналогів простагландину  $F_{2\alpha}$  для синхронізації статевої охоти донорів і реципієнтів.

Для синхронізації статевої охоти найбільш широко застосовуються синтетичні аналоги простагландину  $F_{2\alpha}$  – простин (США), клопстенол, еструмат (Англія), естрофан, ремофан (Чехія), ензапрост (Угорщина), естуфалан, клатрапростин (Росія), овоген (Україна) та інші. Встановлено, що ПГ  $F_{2\alpha}$  є єдиним синтезуємим в матці лютеолітичним фактором, який викликає морфологічну і функціональну регресію жовтого тіла і впливає таким чином на термін статевого циклу. При фронтальному введенні ПГ  $F_{2\alpha}$  без врахування дня статевого циклу приходять в охоту через 48-96 годин лише 55-65% телиць парувального віку. Це пов’язано з стадією розвитку жовтого тіла, в період якого простагландин не проявляє лютеолітичної дії. Для подолання цього використовують дворазове введення препарату з інтервалом в 10-12 днів між ін’єкціями, що викликає статеву охоту у 90% телиць-реципієнтів, решта телиць не приходять в охоту, бо не мають на яєчниках функціонуючих жовтих тіл взагалі.

Синхронність охоти у донорів і реципієнтів повинна бути такою, щоб забезпечити максимум реципієнтів в охоті на протязі доби. При дворазовій обробці реципієнтів охота спостерігається у 85% телиць через 48-56 годин, у 5% через 72 години, інші приходять в охоту пізніше, або взагалі не приходять. Синтетичний аналог простагландину  $F_{2\alpha}$  вводять коровам-

реципієнтам разом з введенням його коровам-донорам, а телицям-реципієнтам на 12-18 годин раніше, ніж коровам-донорам.

Співробітниками нашої кафедри вивчалась синхронізація статевої охоти у телиць парувального віку – 16-18 місяців. Попередньо проводили ректальні дослідження, по наслідкам якого бракували 10-15% телиць з різними гінекологічними відхиленнями, а також тих, що мали дозріваючі фолікули на яєчниках. Для синхронізації статевої охоти відбирали тільки телиць, які мали на яєчнику функціонуюче жовте тіло, розміром не менше 1-1,5 см. Під час ректального дослідження проводили масаж матки, яєчників та компресію маткових артерій.

Найкращі результати одержані при синхронізації статевої охоти телиць-реципієнтів після ректального дослідження одноразовим введенням синтетичних аналогів простагландину  $F_{2\alpha}$  - 500 мкг естрофану або 750 мкг клатрапростину в комплексі з 10% суспензією АСД-Ф2 (асептичний стимулятор Дорогова 2 фракція) на тетравіті (7-10 мл внутрішньом'язево). Протягом 56 годин після введення препаратів проявили статеву охоту 95-98% телиць-реципієнтів.

### Лекція № 3 «Трансплантація ембріонів»

План:

1. Біологічні основи трансплантації ембріонів с.-г. тварин.
2. Відбір донорів та реципієнтів.
3. Методи викликання поліовуляції, гормональні схеми обробки донорів.
4. Синхронізація охоти у реципієнтів.
5. Осіменіння донорів.
6. Методи та способи вимивання ембріонів у різних видів с.-г. тварин.

#### **1. Біологічні основи трансплантації ембріонів с.-г. тварин.**

Під трансплантацією ембріонів розуміють видобування ембріонів з статевих шляхів самок-рекордисток і пересадка їх в статеві шляхи менш продуктивним самкам-реципієнтам. Найбільш широко цей біотехнологічний метод застосовується в скотарстві. Перевагою трансплантації ембріонів є можливість одержання від самок-рекордисток нащадків значно більше, ніж при фізіологічній репродукції. Потенційна можливість яєчників корів нараховує 300–400 тис. зародкових клітин, але за один естральний цикл овулює лише 1–2 клітини, тому за рік в середньому одержують одного нащадка.

#### **2. Відбір донорів та реципієнтів.**

Донорів відбирають, виходячи з мети трансплантації, і враховують цілий ряд зооветеринарних вимог. При відборі в донори використовують дані первинного зоотехнічного і племінного обліку, показники клінічної та гінекологічної диспансеризації, результати вагінального та ректального дослідження статевих органів.

Корови повинні бути чистопорідні, по комплексу селекційних ознак відповідати вимогам класу еліта-рекорд:

- молочна продуктивність за декілька лактацій повинна на 50–60 % бути вище стандарту породи, а вміст жиру і білку в молоці – рівним або вищим за стандарт;

- корова повинна мати відоме походження, мати в родоводі видатних предків, підтверджене племінним свідоцтвом;
- при відборі враховується форма вимені, швидкість молоковіддачі, резистентність до стресових явищ виробництва.

Відбір корів-донорів проводять в господарствах, благополучних по інфекційним, вірусним та інвазійним захворюванням:

- корови повинні бути клінічно здорові, перевірені на туберкульоз, бруцельоз, інвазійні хвороби;
- корови повинні бути середнього віку, бажано з 3–5 лактацією.

Вибраковані корови можуть використовуватись тільки при високій племінній і продуктивній цінності, хорошому здоров'ї і при умові, що причини вибраковки не пов'язані з репродуктивною здатністю:

- корови повинні мати нормальні статеві цикли, легкі роди, без затримок посліду, без післяродових захворювань статевих органів, не мати маститів.

Кінцевий відбір проводять після встановлення реакції яєчників на введення гонадотропних препаратів і пробного вимивання ембріонів:

- реакція яєчників повинна бути не менше 5 жовтих тіл і не менше 4 повноцінних ембріонів, придатних до заморожування або пересадки.

В умовах господарства корів-донорів можна використовувати разово або багаторазово. При разовому використанні корова після вимивання ембріонів в наступну охоту осіменяється і використовується як молочна. Корови донори, які знаходяться в центрі трансплантації, використовуються для багаторазового одержання ембріонів. Після вимивання ембріонів донор приходить в охоту через 30–40 днів, але доцільно пропустити 2-3 цикли після вимивання, а тоді знову починати гормональну обробку.

Реципієнтом може бути телиця або корова, яка по племінній якості нижче за донора. Реципієнту пересаджують в роги матки один чи два ембріони або після штучного осіменіння підсаджують ще один ембріон. Співвідношення реципієнтів і донорів повинно бути 3 або 5 до одного.



При відборі реципієнтів виходять з таких вимог до них:

- реципієнти повинні бути клінічно здорові, з добре розвинутою статевою системою, без патології статевих шляхів;
- відбирають тварин міцної конституції, розвинених не нижче стандарту по породі. Телиці повинні бути парувального віку, 16-18 місяців, живою масою 350-420 кг;
- з метою запобігання розповсюдження інфекційних та інвазійних хвороб реципієнтів досліджують за тими ж показниками, що й донорів.

Не використовують в якості реципієнтів тварин дрібних порід для пересадки ембріонів від порід, більш крупних за масою. При ректальному дослідженні тварин-реципієнтів оцінюють функціональний стан та розміри яєчників, наявність фолікулів та жовтих тіл.

Пересадку ембріонів реципієнтам проводять на 7-8 день після статевої охоти при наявності на яєчнику функціонуючого жовтого тіла, розміром не менше 1-1,5 см.

Однією з головних умов одержання якісних ембріонів і життєздатних нащадків є науково обґрунтована годівля та утримання донорів і реципієнтів. Тому їх забезпечують повноцінною годівлею, відповідними умовами утримання, активним моціоном та уважним спостереженням за проявами статевих циклів.

### **3. Методи викликання поліовуляції, гормональні схеми обробки донорів**

Викликання суперовуляції у донорів засновано на підвищенні вмісту в їх крові фолікулостимулюючого гормону (ФСГ), за рахунок чого відбувається стимуляція дозрівання багатьох фолікулів, індукція в відповідний момент регресії жовтого тіла і овуляції максимальної кількості зрілих фолікулів. В практику виробництва впроваджено застосування для викликання суперовуляції препарати сироваточного гонадотропіну сироватки

крові жеребних кобил (СЖК), та гіпофізарного гормону – фолікулостимулюючого (ФСГ).

### Викликання суперовуляції за допомогою СЖК.

Для викликання суперовуляції застосовують препарати СЖК – Гравогормон та серогонадотропін виробництва Росії, гонадотропін СЖК – Чехія, маротропін – Німеччина, ГСЖК фолігон – Голандія та інші. В тваринництві СЖК використовується в нативному, очищеному, концентрованому та порошкоподібному вигляді, одержаному шляхом ліофілізованої сушки сироватки крові кобил.

Кров у жеребних кобил беруть на 50–100 день жеребності один раз на тиждень з розрахунку 10 мл на 1 кг живої маси тварини, т.п. 4–5 літри від кожного донора. Завадовський М.М. встановив, що гонадотропний гормон СЖК виробляється клітинами ендометрію кобил з 40 по 130 жеребності, максимальна його концентрація буває на 50–100 день. Він не проходить через нирочні фільтри і тому не виявляється в сечі. Сироваточний гонадотропін володіє фолікулостимулюючою і лютеїнізуючою дією, причому перша в 2–3 рази сильніша за другу.

Гормональний титр сироватки визначений за вмістом гонадотропінів, коливається від 60 до 300 І.О. в 1 мл нативної сироватки, що в середньому складає 120–180 І.О. в 1 мл. Оптимальною дозою СЖК для викликання суперовуляції вважається 5–6 тис. І.О. нативного або 2,5–3 тис. І.О. очищеного препарату. Збільшення дози СЖК викликає імунні реакції з утворенням антитіл проти гонадотропінів і навіть анафілактичні явища – шок. Тому спочатку необхідно вводити 2 мл препарату і лише при відсутності побічних явищ вводити залишкову кількість. При застосуванні очищених препаратів СЖК, таких як фолігон, немає потреби робити пробу.

При викликанні суперовуляції застосовують різні схеми гормональної обробки корів-донорів (таблиця 1).

Таблиця 1

## Схеми підготовки корів-донорів за допомогою СЖК

День естрального циклу	Назва препарату	Доза
Схема 1		
8 - 13	Гонадотропін СЖГ	2000 – 3500 І.О.
Продовження таблиці 1		
10 - 15	Простагландин	30 – 50 мг або 500 мкг
12 - 17	Охота і осіменіння	
21 - 23	Вимивання ембріонів	
Схема 2		
10 - 12	ГСЖК	3000 – 3500 І.О.
	Хоріогонін	500 І.О.
12 - 14	Простагландин	30 – 50 мг або 500 мкг
14 – 16	Охота і осіменіння	
21 - 23	Вимивання ембріонів	
Схема 3		
2	Вітаміни А, Е	150000 М.О., 100 мг
	Йодистий калій	100 – 200 мг
10 - 12	ГСЖК	2500 – 3000 І.О.
	Вітамін А, Е	75000 М.О., 50 мг
12 - 14	Простагландин	30 мг або 500 мкг
14 - 16	Охота і осіменіння	
21 - 23	Вимивання ембріонів	
Схема 4		
0	Вітамін А, Е	150000 М.О., 100 мг
	Йодистий калій	100 – 200 мг
	Санація матки	100 – 150 мг
10 -12	ГСЖК	2500 – 3000 І.О.
	Вітамін А, Е	75000 М.О., 50 мг
12 - 14	Простагландин	30 мг або 500 мкг
14 - 16	Охота і осіменіння	
21 - 23	Вимивання ембріонів	
24 - 26	Простагландин	30 мг або 500 мкг

За “0” день циклу приймається день спонтанної повноцінної охоти. В цей день проводиться дослідження статевих органів, при потребі санація матки та вводяться внутрішньом’язево вітамінні препарати.

На 10–12 день циклу проводять ректальне дослідження і якщо яєчник має повноцінне жовте тіло, то починають гормональну обробку донора з

метою викликання суперовуляції. Введення препаратів повинно проводитись в один і той же час, краще вранці або ввечері.

В таблиці вказана доза ГСЖК в межах для корів-донорів з різною живою масою . Вітчизняні препарати ГСЖК вводять одноразово внутрішньом'язево в максимальних дозах – 3000-3500 І.О. Препарат фолігон (Голандія) вводять в дозах значно менше – 2000-2500 І.О. на корову. Це пов'язано з тим, що високі дози фолігону можуть викликати кістозне переродження яєчників, тому корови-донори не відновлюють статевого циклу.

Схеми викликання поліовуляції з застосуванням ГСЖК, при вірному і обережному використанні досить ефективні. Так, кількість дозрілих фолікулів на момент овуляції при введенні ГСЖК становить 9–12 і більше на один яєчник. Однак в багатьох випадках фолікули дозрівають несинхронно, час їх дозрівання розтягується, це пов'язано з великим періодом піврозпаду ГСЖК – 5-6 діб. Тому на час вимивання (7-8 день) в яєчнику виявляється разом з жовтими тілами значна кількість овульованих або неовульованих фолікулів. Крім того, часто важко підібрати оптимальну дозу ГСЖК, а при передозуванні викликається кістозне переродження яєчників. Багаторазова обробка донорів ГСЖК викликає імунний ефект, в результаті на ньому утворюються імунні тіла, які призводять до зменшення овуляції, асинхронної функції яєчників і матки. У зв'язку з цим виникає необхідність обробки донорів СЖК-антисироваткою, яка нейтралізує небажану довгострокову дію ГСЖК.

#### Викликання суперовуляції за допомогою ФСГ.

Фолікулостимулюючий гормон (ФСГ) – гормон передньої долі гіпофізу, він сприяє росту фолікула і дозріванню яйцеклітини. ФСГ при викликанні суперовуляції дає більш високі і стабільні результати в порівнянні з ГСЖК. Так ФСГ забезпечує значно більший вихід якісних і нормальних ембріонів на одного донора. Якщо при введенні ГСЖК вихід нормальних ембріонів складає в середньому 3–5 за одну обробку, то ФСГ

забезпечує значно більший вихід ембріонів – 7-10. При введенні ФСГ зустрічається менше випадків залишкових патологічних явищ в яєчниках. Реакція яєчників на ФСГ менш бурхлива, ніж при введенні ГСЖК. Яєчники хоча і вміщують більше розвинутих фолікулів, але не так сильно збільшуються в об'ємі і не такі чутливі при пальпації. Єдиним недоліком схем застосування ФСГ є багаторазовість його введення, що може викликати небажані стресові явища та потребує значних затрат праці.

Загальна доза ФСГ складає 50 мг на донора на одну обробку. Вводять ФСГ протягом 4–5 днів вранці і ввечері. Інтервал між ін'єкціями 12 годин, його необхідно суворо дотримуватись.

Але у багатьох центрах по трансплантації використовують інші схеми обробки донорів на ФСГ (таблиця 2).

Таблиця 2

### Схеми підготовки корів-донорів за допомогою ФСГ

День циклу	Схема 1		Схема 2		Схема 3		Схема 4	
	Ранок	Вечір	Ранок	Вечір	Ранок	Вечір	Ранок	Вечір
0	Вітамін А, Е		Вітамін А, Е		Вітамін А, Е		Вітамін А, Е	
	150000 М.О.		150000 М.О.		150000 М.О.		150000 М.О.	
	100 мг		100 мг		100 мг		100 мг	
10	ФСГ		ФСГ		ФСГ		ФСГ	
	7 мг	7 мг	2,5 мг	2,5 мг	5 мг	5 мг	6 мг	6 мг
11	ФСГ		ФСГ		ФСГ		ФСГ	
	6 мг	6 мг	5 мг	5 мг	5 мг	5 мг	5 мг	5 мг
12	ФСГ		ФСГ		ФСГ		ФСГ	
	5 мг	5 мг	7,5 мг	7,5 мг	5 мг	5 мг	3 мг	3 мг
	ПГФ <sub>2α</sub>		ПГФ <sub>2α</sub>		ПГФ <sub>2α</sub>		ПГФ <sub>2α</sub>	
	500 мкг		500 мкг		500 мкг		500 мкг	
13	ФСГ		ФСГ		ФСГ		ФСГ	
	4 мг	4 мг	7,5 мг	7,5 мг	5 мг	5 мг	3 мг	3 мг
14	ФСГ		ФСГ		ФСГ		ФСГ	
	3 мг	3 мг	2,5 мг	2,5 мг	5 мг	5 мг		
	Осіменіння		Осіменіння		Осіменіння		Осіменіння	
15	Осіменіння		Осіменіння		Осіменіння		Осіменіння	
21 - 22	Вимивання ембріонів		Вимивання ембріонів		Вимивання ембріонів		Вимивання ембріонів	

Як видно з таблиці, разом зі схемою, яка передбачає щоденні введення однакових доз ФСГ, застосовується схема 1 з пониженням кількості введеного препарату, а також схема 2 з наростанням дози препарату. Схема 4, яка розроблена нами, розрахована на зменшення загальної дози введення ФСГ до 34 мг на донора. Ця схема включає 4 дні обробки корів-донорів. Починають введення препарату на 10-й день статевого циклу і вводять ФСГ вранці і ввечері зменшуючи дозу з 12 мг у 1-й день обробки до 6 мг на 4-й.

На 3-й день обробки коровам вводять синтетичний аналог простагландину  $F_2\alpha$ . Вимивали 5-6 якісних ембріонів, придатних до пересадки та заморожування. Для проведення планомірної підготовки до трансплантації груп донорів і реципієнтів складається гормонограма.

#### 4. Синхронізація охоти у реципієнтів

Успіх трансплантації та приживлення ембріонів залежить від синхронності статевого циклу донора і реципієнта, а при використанні заморожено-відтаяних ембріонів їх стадії розвитку та дня статевого циклу реципієнта.

Для синхронізації статевої охоти найбільш широко застосовуються синтетичні аналоги простагландину  $F_2\alpha$  – простин (США), клопстенол, еструмат (Англія), естрофан, ремофан (Чехія), ензапрост (Угорщина), естуфалан, клатрапростин (Росія), овоген (Україна) та інші. Встановлено, що ПГ  $F_2\alpha$  є єдиним синтезуємим в матці лютеолітичним фактором, який викликає морфологічну і функціональну регресію жовтого тіла і впливає таким чином на термін статевого циклу. При фронтальному введенні ПГ  $F_2\alpha$  без врахування дня статевого циклу приходять в охоту через 48-96 годин лише 55-65% телиць парувального віку. Це пов'язано з стадією розвитку жовтого тіла, в період якого простагландин не проявляє лютеолітичної дії. Для подолання цього використовують дворазове введення препарату з інтервалом в 10-12 днів між ін'єкціями, що викликає статеву охоту у 90%

телиць-реципієнтів, решта телиць не приходять в охоту, бо не мають на яєчниках функціонуючих жовтих тіл взагалі.

Синхронність охоти у донорів і реципієнтів повинна бути такою, щоб забезпечити максимум реципієнтів в охоті на протязі доби. При дворазовій обробці реципієнтів охота спостерігається у 85% телиць через 48-56 годин, у 5% через 72 години, інші приходять в охоту пізніше, або взагалі не приходять. Синтетичний аналог простагландину F2 $\alpha$  вводять коровам-реципієнтам разом з введенням його коровам-донорам, а телицям-реципієнтам на 12-18 годин раніше, ніж коровам-донорам.

На протязі 1995 – 2001 років нами вивчалась синхронізація статевої охоти в телиць парувального віку – 16-18 місяців. Попередньо проводили ректальні дослідження, по наслідкам якого бракували 10-15% телиць з різними гінекологічними відхиленнями, а також тих, що мали дозріваючі фолікули на яєчниках. Для синхронізації статевої охоти відбирали тільки телиць, які мали на яєчнику функціонуюче жовте тіло, розміром не менше 1-1,5 см. Під час ректального дослідження проводили масаж матки, яєчників та компресію маткових артерій.

Найкращі результати одержані при синхронізації статевої охоти телиць-реципієнтів після ректального дослідження одноразовим введенням синтетичних аналогів простагландину F2 $\alpha$  - 500 мкг естрофану або 750 мкг клатрапростину в комплексі з 10% суспензією АСД-Ф2 (асептичний стимулятор Дорогова 2 фракція) на тетравіті (7-10 мл внутрішньом'язево). На протязі 56 годин після введення препаратів проявили статеву охоту 95-98% телиць-реципієнтів.

## **5. Осіменіння донорів**

Питання осіменіння донорів потребує ретельного підходу і досконалого вивчення. Часто без яких-небудь причин при вимиванні ембріонів одержують незапліднені яйцеклітини. При цьому слід враховувати, що овуляція при великій кількості розвинутих фолікулів, як правило, не відбувається синхронно і часто затягується до 36-56 годин, тому рекомендують

збільшувати кратність осіменіння корів-донорів. Тобто осіменяти необхідно протягом всієї охоти, через 12 годин, щоб в одноразовій дозі сперми було 50-70 млн активних сперміїв.

Найкращі наслідки осіменіння корів-донорів одержуються при застосуванні ректо-цервікального способу осіменіння. У корів-донорів, оброблених препаратами гонадотропину, охота сильно виражена, яскрава. Майже в усіх них відкрита шийка матки і сперму вдається ввести значно глибше в канал шийки матки. Але слід враховувати, що оброблені корови донори мають підвищену чутливість статевих органів до ректальної пальпації і інфекції, тому осіменяти необхідно дуже обережно. Необережні маніпуляції можуть викликати зміщення бахромки яйцепроводу і тоді не всі яйцеклітини попадають в яйцепровід. Крім того, необережна пальпація яєчників може викликати передчасні розриви передовуляційних фолікулів і вихід незрілих яйцеклітин.

Введені в цервікальний канал спермії, перестальтичними скороченнями матки засмоктуються і поступово проштовхуються в сторону яйцепроводу, цьому також сприяє наявність в спермі простагландину. В матці відбувається капацітація сперміїв і відбір найбільш життєздатних, тому кількість їх зменшується і лише невелика частка досягає яйцепроводу. Спермії просуваються в яйцепроводах за рахунок його перестальтики, миготливих рухів в'їчастого епітелію слизової оболонки, власних рухів та здатності до реотаксису.

Яйцеклітини після овуляції попадають на бахромку яйцепроводу і просуваються разом з течією рідини в яйцепроводі, рухаючись в напрямку матки. Життєздатність яйцеклітин в яйцепроводах зберігається протягом 10-12 годин, тому що вони виходять з фолікулів незрілими, в стані овоциту 2 порядку. Яйцеклітини складаються з ядра і протоплазми, оточені жовтковою та прозорою (блискучою) оболонкою. Ззовні яйцеклітина оточена фолікулярними клітинами променевого вінця.



В верхній третині яйцепроводу відбувається зустріч яйцеклітин з сперміями і починається процес запліднення. При заплідненні розрізняють стадії: проникнення сперміїв в яйцеклітину; активування яйця і створення блоку поліспермії; утворення двох пронуклеусів; заміна пронуклеусів хромосомними групами; об'єднання двох хромосомних груп (сінгамія); утворення зиготи.

Накопичені в області перешийка яйцепроводів спермії набувають здатності до просування в сторону яєчника тільки після овуляції фолікула, з надходженням фолікулярної рідини у яйцепроводи. Проникнути через шари фолікулярних клітин і прозору оболонку можуть тільки капацизовані, високоактивні спермії, для цього їм необхідно від 2 до 6 годин перебування в статевих шляхах самки.

При проникненні спермія через прозору оболонку яйцеклітини, він втрачає акрозому і плазматичну мембрану і прикріплюється до жовткової оболонки. В яйцеклітині це викликає активізацію обмінних процесів і друге ділення ядра з виштовхуванням полярного тільця. Головка і шийка спермія проникають в цитоплазму яйця, а відділений хвостик залишається в коложовтковому просторі. Головка спермія збільшується до розмірів ядра яйцеклітини, яке трансформується в жіночий пронуклеус, а головка в чоловічий. Чоловічий і жіночий пронуклеуси наближаються і, втративши оболонки, перетворюються в хромосомні набори, які об'єднуються в ядро нової клітини – зиготи, яка має диплоїдний набір хромосом.

Ядро зиготи поступово ділиться з інтервалом 24 години на два, чотири, вісім і далі бластомерів. Через 3-6 днів ембріон поступає в роги матки на стадії 8-16 бластомерів і далі розвивається в морулу, бластоцисту і еспандьований ембріон далі зародок і плід.

Запліднення яйцеклітини залежить від якості сперми, тому биків слід підбирати не тільки за генетичним потенціалом, а і за запліднюючою здатністю їх сперміїв.

## **6. Методи та способи вимивання ембріонів у різних видів с.-г. тварин**

До середини 70-х років ембріони в корів видобували хірургічним методом з яйцепроводів або з рогів матки в залежності на якій стадії проводили операцію. При цьому застосовували наступні методи:

- видобування ембріонів через розріз верхнього склепіння піхви – трансвагінальний метод;
- часткової гістероектомії за допомогою кастраційних щипців в донорів, які вибраковуються і здаються на забій;
- з геніталій забитих тварин;
- шляхом лапаротомії по білій лінії, який частіше застосовувався на телицях;
- шляхом лапаротомії в області голодної ямки.

Але на сучасному етапі впровадження трансплантації ембріонів великої рогатої худоби хірургічні методи застосовуються більше з наукових цілей.

У виробництві вимивання ембріонів проводять нехірургічним способом. Головні переваги нехірургічного вимивання ембріонів полягають в відносній простоті виконання, без особливого ризику втрати репродуктивної здатності донорів і повторного їх використання. Цей метод не потребує спеціального операційного приміщення, що дозволяє успішно застосовувати його безпосередньо на тваринницьких фермах. Оволодіти технікою вимивання ембріонів не складно, але від майстерності залежить ефективність вимивання і успіх трансплантації в цілому.

Для вимивання ембріонів нехірургічним методом бажано мати манеж, станок для фіксації донора. В умовах молочних ферм для цих цілей можна використовувати приміщення пункту штучного осіменіння з додатковим дообладнанням стерильної кімнати або настільного боксу для роботи з ембріонами.

Інструменти для вимивання ембріонів існують різних конструкцій: жорсткі металеві, гнучкі пластикові або гумові. Найбільш широко в практиці

трансплантації для вимивання ембріонів використовують двоканальні катетери з гуми або еластичної пластмаси. Катетер складається з трубки, кінець якої – робоча частина – має надувний балончик і 4-6 отворів, які забезпечують введення і виведення промивного середовища. Кінець трубки залитий гумою, пластмасою або має жорсткий наконечник з сквозним отвором для фіксації кінчика стилету.

Надувний балончик натягнутий на робочу трубку і зафіксований герметично з обох кінців, до нього підходить надувний канал, який має вихід назовні. Кінцева частина надувного каналу має розширений контрольний балончик. Зовнішній кінець катетеру має замковий вузол для фіксації стилету в катетері за допомогою різьбового з'єднання головки стилету з кінцевою частиною металевго перехідника, вставленого в трубку.

Приведення в робочий стан катетеру відбувається таким чином: в зовнішній конусоподібний кінець катетеру вставляється металевий перехідник. Після чого, через цей перехідник вводять металевий стилет, для надання катетеру жорсткості і фіксують його в кінчику робочої частини. Зовнішній кінець стилету півобертом фіксують в металевому перехіднику, вставленому в катетер.

Перед роботою складові частини катетеру стерилізують кип'ятінням в дистильованій воді протягом 30 хв. Гумові і пластикові катетери стерилізують холодним способом, заливаючи в стерильні ємкості 70° спиртом за 1,5 – 2 години до початку роботи. Перед вимиванням внутрішній канал катетера промивають стерильним розчином Дюльбекко. Катетер в зібраному стані зовні обробляють силіконом або кероланом і поміщають в захисний поліетиленовий чохол.

Вимивання ембріонів проводять на 7–8 – й день від початку статевої охоти. Безпосередньо перед вимиванням корову-донора фіксують в станку, звільняють пряму кишку від калових мас. Зовнішні статеві органи та перинеальну область миють водою з милом, висушують серветкою, дезінфікують аерозолем “Септонекс” або 70° етанолом. Для зняття напруги

прямої кишки проводять сакральну анестезію 2% розчином новокаїну в дозі 5 – 10 мл. Новокаїн вводять між останнім крижовим і першим хвостовим хребцями. Донорам можна вводити внутрішньо-м'язово міорелаксанти – рампунь 0,5 – 0,7 мл або комбілен 0,7 – 1,0 мл.

Катетер в чохлі вводять в піхву по верхньому склепінню до шийки матки, його розчохлають і вводять в цервікальний канал шийки матки. Обережними рухами натягують шийку на катетер і просувають його по каналу шийки до біфуркації, а потім в один з рогів матки. Коли катетер доходить до великої кривизни рогу матки, стилет поступово видаляють по мірі просування катетера до верхівки рогу. Коли катетер доходить до верхівки рогу в балончик при допомозі шприца накачують 10 – 20 мл повітря. Перевіривши розміщення катетера в розі матки і ступінь перекриття балончиком рогу з катетера виводять стилет. Після цього продувають катетер стерильним повітрям і контролюють його вихід назовні. До задньої частини катетера через трійник приєднують промивну систему: поліетиленові трубки, зажими, флакони з промивною рідиною і порожні флакони для збирання рідини з ембріонами.

Посуд для збору рідини з ембріонами розміщують в термоізолюючий матеріал, а флакон з промивною рідиною закріплюють вище висоти донора – 190 – 200 см. Промивну рідину вводять в верхівку рога за допомогою шприца ємкістю 60 і більше мл, або самопливом і перекривають зажимом трубку. Рукою, введеною в пряму кишку, легко масажують верхівку рогу матки, потім знімають зажим і випускають рідину з ембріонами в порожній посуд. Наповнення рогу матки промивною рідиною та її відтік контролюють ректально. Для більш повного видалення промивної рідини проводять обережно масаж і підняття верхівки рогу. Суворо контролюють кількість введеної і зібраної промивної рідини. Через рог пропускають порціями по 50–100 мл промивної рідини, загальної кількістю 200-500 мл на один рог матки.

По закінченню вимивання з балончика катетера випускають повітря і, витягнувши катетер, ще раз ретельно промивають систему, щоб змити

ембріони з стінок. Можна не виводити катетер назовні, а довести його до біфуркації і знову вставивши стилет, завести в другий ріг матки. аналогічно вимивають і другий ріг.

На етикетку ємкості з ембріонами наносять інформацію – правий чи лівий ріг, кількість жовтих тіл на яєчнику з цього боку, час закінчення вимивання, і ємкість залишають на відстоювання. Кількість жовтих тіл на яєчнику повинна дорівнювати кількості одержаних ембріонів.

Для санації в матку після вимивання вводять суміш антибіотиків – пеніцилін + стрептоміцин по 500 тис. І.О. в 20 мл 0,5% розчину новокаїну або йодосол. Донору також внутрішньо-м'язово вводять 500 мкг аналогу простагландину для швидкого розсмоктування жовтих тіл.

Але буває при хорошій реакції донора на гормональну обробку невдале вимивання ембріонів. Це трапляється тоді, коли в донора не вдається провести катетер через шийку матки, особливо в телиць-донорів. Деколи не виводиться стилет після введення в ріг матки катетера. Виймають катетер і підбирають новий стилет. Можлива закупорка отворів катетера цервікальним слизом, який не дає можливості витікати промивній рідині.

Прокол або розрив ендометрію, які можуть виникати при великому або швидкому наповненню балончика повітрям. В цьому випадку промивне середовище попадає під міометрій і відтік його стає важким. Тому повітря необхідно вводити поступово, нешвидко порціями до 10 – 15 – 20 см<sup>3</sup> (мл).

Пошкодження слизової оболонки матки, які можуть виникати за інтенсивних маніпуляцій при промиванні рогу матки, стисканні рукою та використанні безманжетних катетерів. при цьому в промивній рідині з'являється кров.

## Лекція № 4 «Технологія роботи з ембріонами»

План:

1. Стадії розвитку ембріонів.
2. Методи оцінки визначення придатності ембріонів до пересадження.
3. Підготовка реципієнтів до трансплантації ембріонів.
4. Техніка і методи трансплантації ембріонів у різних видів тварин.
5. Контроль та облік результатів трансплантації.

### 1. Стадії розвитку ембріонів.

Біологічно повноцінні ембріони мають чітку кулясту форму, прозору гомогенну цитоплазму, непошкоджену прозору оболонку, однакового розміру бластомери з щільним міжклітинним комплексом. Ембріони, що містять різних розмірів бластомери з нечіткими клітинними мембранами та іншими ознаками дегенерації, вважаються неповноцінними.

Оцінюючи стан кожного ембріона, звертають увагу на: відповідність стадії розвитку ембріона його віку; форму прозорої оболонки та її цілість; рівномірність дроблення бластомерів; стан цитоплазми; прозорість перивітелінового простору.

Нижче наводяться основні риси ембріона на ранніх стадіях його розвитку. Ці риси слід чітко пам'ятати і по них оцінювати "вік" ембріона, його повноцінність. При вимиванні ембріонів з яйцепроводів практично всі вони бувають на стадії ранньої морули, тоді як при вимиванні ембріонів з рога матки більшість з них буває на стадії ранньої бластоцисти. Внаслідок деякої розтягнутості суперовуляції тут можуть зустрічатися і морули, і пізні бластоцисти, і незапліднені яйцеклітини в стані дегенерації (зі зморщеною, нерівної форми цитоплазмою), і, нарешті, зародки неправильної форми, з порушеннями цілості прозорої оболонки, її розривами, розшаруваннями, стисненою порожниною, нерівномірним дробленням, порушеннями міжклітинних зв'язків, грануляцією протоплазми. Відправною ризикою при

оцінюванні ембріонів є день циклу, на який проводиться вимивання, і типічні для даного “віку” риси ембріона.

Ембріони, що різко відстали у своєму розвитку, з вираженими ознаками асинхронності дроблення бластомерів, їх дегенерації непридатні для трансплантації, тоді як ембріони з незначними морфологічними змінами вважаються умовно придатними.

Значно більші зміни спостерігаються у збережених у замороженому стані ембріонів, тому оцінка їх буває важчою.

## **2. Методи оцінки визначення придатності ембріонів до пересадження.**

Як правило, лише частина вимитих ембріонів придатна для трансплантації. Тому їх необхідно оцінити за деякими морфологічними ознаками. За життєздатністю ембріони поділяють на п'ять категорій (за даними Шульган І.З. та Шаловила С. Г., 1986):

I – відмінні, ідеальні, відповідають дню вимивання, однорідні, округлої форми з непошкодженою прозорою оболонкою, чіткими, однаковими за величиною бластомерами;

II – хороші, у яких декілька клітин відокремлені від загальної маси, бластомери неоднакові за величиною, розміщені щільно й несиметрично;

III – задовільні, неоднорідні, в перивітеліновому просторі можуть бути включення (відокремлені клітини), бластомери частково ущільнені;

IV – незадовільні, що мають зону пелюциду не округлої форми, наявність дегенерованих клітин, порушення зв'язку між бластомерами – ущільнення й зморщення бластомерів;

V – дегенеровані, що не відповідають стадії розвитку ембріона. На 7-й день мають 8 бластомерів, спостерігається дефект прозорої оболонки, значне ущільнення бластомерів.

Для пересадки використовують в основному ембріони I–IV категорій

Життєздатність ембріонів можливо оцінити в період їх культивування у спеціальних середовищах (199, Хема-10, Дюльбекко) за температури +37°C. Також, можна використовувати метод фарбування, що ґрунтується на різному ступені проникнення барвників через прозору оболонку живих чи загиблих ембріонів.

Після вимивання із статевих шляхів самок зародки оцінюють і визначаючи їх якість. Зародки відмінної, хорошої, а у ряді випадків і задовільної якості відбирають для пересадки реципієнтам. Використовують як свіжоодержані, так і заморожено-розморожені зародки.

### **3. Підготовка реципієнтів до трансплантації ембріонів.**

Однією з основних умов високого рівня приживлення ембріонів є синхронізація охоти у донора і реципієнтів. Різниця в часі не повинна перевищувати  $\pm 24$  години, оптимальні результати одержують за різниці не більше 12 годин. Особливо слід зазначити, що синхронізація ембріон-реципієнт має важливіше значення для успішної трансплантації, ніж синхронізація донор-реципієнт. Нині пересадку ембріонів реципієнтам здійснюють хірургічним і нехірургічним методами.

Підготовку реципієнта проводять таким чином: їх фіксують в станку або на місті в стійлі, миють теплою водою з милом зовнішні статеві органи, витирають серветкою і дезінфікують. Після цього роблять сакральну анестезію 2% розчином новокаїну 5-7 мл, а сильнозбудливим реципієнтам вводять внутрішньом'язево міорелаксант комбелен 0,5 або ханегіф 10 мл, рампун.

### **4. Техніка і методи трансплантації ембріонів у різних видів тварин.**

До середини 70-х років пересадку ембріонів проводили хірургічним методом, але тепер добре розроблені і впроваджені у виробництво нехірургічні методи пересадки ембріонів телицям-реципієнтам і коровам.



Хірургічний метод потребує операційної практики, спеціальних приміщень, відповідного обладнання і інструментів. Цей метод дозволяє ввести ембріони глибоко в ріг матки, що не завжди можливо при нехірургічному методі. Але хірургічний метод належить до полостних операцій, тому необхідна сувора стерильність, тварині наносяться травми при резекції тому неможливо реципієнта використовувати багаторазово. Ефективність хірургічної пересадки ембріонів дорівнює 60-70%.

Перші дослідження по не хірургічній пересадці ембріонів проведені на початку 60-х років. При цьому використовувались різні інструменти у вигляді трубок та катетерів.

На перший погляд пересадка ембріонів нагадує метод штучного введення сперми з ректальною фіксацією шийки матки. Але фактично пересадка значно складніша. Якщо під час осіменіння шийка матки відкрита, слизові оболонки геніталій гіперемовані і ослизнені, а цервікальний слиз володіє бактерицидними властивостями, то під час пересадки ембріонів шийка закрита, полость матки стерильна, слизові оболонки дуже чутливі, легкораніми і бактерицидні властивості маткового секрету знижені. Все це необхідно враховувати при роботі, звертаючи особливу увагу на асептику та майстерність техніки.

Необхідно також пам'ятати, що резистентність матки в лютеальну фазу знижується і чутливість ендометрія до інфекції підвищується. Тому бактеріальна інфекція, яка може проникати в матку при пересадці, значно понижує приживленість ембріонів. При пересадці можливе травмування ендометрію інструментами. Виникаючи при цьому крововиливи негативно впливають на ембріони, тому що кров являється ембріотоксичною рідиною.

Розроблено багато пристроїв та катетерів для нехірургічної пересадки ембріонів. Найбільш широке застосування знайшли катетери, які складаються з металевого тіла – трубки і поршня, за допомогою якого ембріон витискають з пайєти, а також захисних кожухів та чохла – французька фірма ІМВ, німецька мінітюб та ін. Перед початком роботи

інструменти стерилізують кип'ятінням, висушують і зберігають в настільному боксі під бактерицидною лампою, яку вмикають перед початком роботи. Перед введенням катетера в статеві шляхи його дезінфікують і покривають силіконом. Пасти, в якій знаходиться ембріон, вставляють в наконечник катетера і приєднують до нього поршень, легко натискаючи на поршень, перевіряють, чи виходить крапля середовища з пасти. Назвні катетера надягають санітарний чохол і вводять катетер по верхньому склепінню піхви до шийки матки. Проривають санітарний чохол.

Далі вводять руку в пряму кишку, прощупують матку, визначають, в якому яєчнику знаходиться жовте тіло і під ректальним контролем направляють катетер в шийку матки. Якщо катетер ввели в отвір шийки матки, то обережно натягуємо її на катетер і проштовхуємо його в іпсілатеральний жовтому тілу ріг матки. Обережними рухами вводять катетер якомога ближче до верхівки рогу матки, постійно контролюючи місце знаходження кінця катетера. Якщо катетер правильно введений, його повертають міткою до слизової оболонки і дають команду помічнику натискати на поршень, щоби ембріон з середовищем ввести в матку.

Розроблені методи трансплантації ембріонів і для інших видів тварин, правда поки що вони мають більш наукове, ніж прикладне значення.

У овець добування та пересаджування ембріонів проводять лише хірургічним методом, під загальним чи місцевим наркозом. Р. Аверіл з співробітниками в 1957 р. вперше застосували метод інкубації зигот вівці в організмі кролиці. Вони пересадили семи кролицям 18 овечих ембріонів на стадії 2-х–12-ти бластомерів. Через 4–5 днів кролиць забили і з порожнини матки вимили 9 морул та бластоцист. Дві бластоцисти пересадили вівцематці, у якої овуляція мала місце 6 днів раніше. Через 16 днів її забили і виявили в рогах матки два нормально розвинені ембріони.

Першу трансплантацію ембріонів у свиней здійснив О. В. Квасницький, пересадивши 9 ембріонів, добутих з яйцепроводів миргородської свині, свиноматці великої білої породи і отримав 4-х поросят-трансплантатів. В 60–

70-х роках вдосконалено методику ембріопересаджувань, проведено дослідження по міжконтинентальному перевезенню ембріонів свиней з Канади у Великобританію (Вратали та ін.) та із США в Іспанію (Джеймс і Рісер) і Великобританію (Джеймс з співробітниками).

Складність трансплантації ембріонів у кобил полягає в тому, що у них важко викликати суперовуляцію за допомогою екзогенних гонадотропінів. Тому збільшення кількості приплоду від цінних кобил за допомогою трансплантації можна досягнути шляхом багаторазового отримання поодиноких ембріонів нехірургічним методом. Розповсюдження методу в конярстві обмежується також асоціацією з реєстрації породних коней, яка довгий час не визнавала нащадків, отриманих шляхом штучного осіменіння чи трансплантації ембріонів.

### **5. Контроль та облік результатів трансплантації.**

Не рекомендується протягом двох місяців після пересадки перегруповувати, вакцинувати та піддавати іншим стресовим факторам реципієнтів. Годівля реципієнтів повинна бути повноцінною, тому що низький рівень, незбалансованість раціону викликає порушення обміну речовин, репродуктивної функції і знижує приживлення ембріонів. Через 60–90 днів після пересадки ембріонів реципієнтів досліджують на тільність.

## Лекція № 5 «Зберігання ембріонів та статевих клітин»

План:

1. Короткочасне зберігання.
2. Довготривале зберігання. Методи кріоконсервування.
3. Розморожування ембріонів.

### 1. Короткочасне зберігання.

Від видобування ембріонів у донорів до пересаджування їх реципієнту проходить звичайно не менше 3 годин. Протягом цього часу потрібно зберегти життєздатність ембріонів.

Для цього ембріон можна помістити в 0,5 мл середовища на годинниковому скельці, поставити його в стерильну чашку Петрі, дно якої вистелене вологим фільтрувальним папером, накрити і поставити в термостат з температурою 37 °С.

Для більш тривалого зберігання ембріона (у відповідному середовищі в ампулах, поліхлорвінілових пайетах для осіменіння) засмоктують ембріон в пайету таким чином, щоб з обох боків його утворилися повітряні пухирці довжиною 1–1,5 см. Закривають кінці пайети стальними кульками чи поліетиленовими корками і поміщають в термостат при 37 °С чи під шаром стерильного вазелінового масла на годинниковому склі чи у пробірці.

В таких умовах біологічно повноцінні ембріони можуть зберігатися до 24–48 годин, але в практичних умовах культивування при 37 °С застосовують лише як вимушений короткочасний захід.

В кінці культивування обов'язково перевіряють під мікроскопом життєздатність ембріонів.

Одним з прикладів успішного зберігання ембріонів при температурі тіла є досліди кембріджських вчених по пересаджуванню ембріонів овець у яйцепроводи кролиці, які дозволили здійснити ряд міжконтинентальних перевезень ембріонів з послідуною їх ретрансплантацією. Після

хірургічного пересаджування таких ембріонів отримано нормальних нащадків.

## **2. Довготривале зберігання. Методи кріоконсервування.**

Метод кріоконсервації ембріонів використовується в практиці та наукових дослідженнях для збереження цінних в племінному відношенні тварин і використання в програмах розведення, збереження генофонду зникаючих тварин, перевезення ембріонів на великі відстані, створення банків ембріонів і гамет з необмеженим терміном зберігання. При заморожуванні ембріонів немає потреби штучної синхронізації статевої охоти донора і реципієнта, це полегшує працю при підготовці пересадок. Метод заморожування ембріонів використовується для фундаментальних досліджень взаємодії матері і плода і накопичення ембріонального матеріалу для різних наукових досліджень.

Краща стадія для заморожування ембріонів є бластоциста 60-150 бластомерів т.п. віком 7-8 днів. Для заморожування використовують тільки свіжоодержані ембріони тому що зберігання негативно впливає на їх життєздатність при холодних обробках. Максимальне скорочення часу підготовки ембріонів до заморожування - одне з найголовніших вимог успішного заморожування.

Заморожування і відтаювання ембріонів супроводжується кристалізацією води в бластомерах і концентруванням розчинних речовин в рідкій фазі, що приводить до загибелі ембріона. Ці два процеси відбуваються одночасно, хоча кристалізація більш помітна при швидкому заморожуванні, тоді як осмотичні зміни - при уповільненому. Під час заморожування спочатку знижується температура в навколклітинному середовищі, тут поступово збільшується кількість льоду і збільшується концентрація солей в останній частині розчину. Виникає різниця осмотичного тиску між позаклітинною і внутрішньоклітинною фазами, яка зрівноважується осмотичною реакцією ембріона шляхом віддачі води в навколклітинне

середовище. Щоб запобігти кристалізації води в склад середовища вводять кріопротектори гліцерин або диметилсульфоксид (ДМСО), а щоб запобігти осмотичному впливу штучно стимулюють кристалізацію (сидінг). Введення в склад середовища кріопротектора та його видалення також створює можливість пошкодження ембріона. Тому технології заморожування передбачають поступове введення ембріонів в 0,25; 0,5; 1,0; 1,5 М розчині кріопротектору і витримку в кожному розчині 5 - 10 хвилин, а в останньому 15 - 20 хвилин. При відтаюванні ембріонів їх поступово переносять в розчин з зменшенням вмісту кріопротектору.

Розчини кріопротекторів готують на фосфатносолевому буфері Дюльбекко (ФСБ), використовують хімічно чистий диметилсульфоксид - (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>SO 78,136 спочатку готується 3М розчин - 15,74 мл ФСБ і 4,26 мл ДМСО. Рідкий ДМСО має питому вагу 1,1 г/см<sup>3</sup>, то 4,26 мл буде важити 4,68 г, що відповідає 3М концентрації речовин, розчиненої в 20 мл розчину. Далі з 3М розчину ДМСО готують необхідні його концентрації: 1,5 М розчин ДМСО - потрібно взяти 5 мл 3М ДМСО і 5 мл ФСБ: 1,0 М - 4 мл 1,5 ДМСО і 2 мл ФСБ: 0,5 М - 3мл 1,0М ДМСО і 3мл ФСБ: 0,25 М - 3М 0,5М ДМСО і 3мл ФСБ.

Хімічно чистий гліцерин має молекулярну вагу 92,09. Для заморожування використовують 10% розчин, що складає 1 М концентрацію в ФСБ. Щоб виготовити 10% розчин гліцерину беруть 4мл гліцерину і додають 33 мл ФСБ, для виготовлення розчинів 3,3% і 6,6% беруть відповідно 10 мл ФСБ і додають 5 мл 10% розчину гліцерину і 5 мл ФСБ та 10 мл 10% розчину гліцерину.

Існує два головних методи заморожування–розморожування ембріонів – повільне заморожування і повільне відтаювання, та швидке заморожування і відтаювання.

При повільному заморожуванні спочатку охолоджують ембріон від 20°C до 7°C з швидкістю 1°C за хвилину, викликають штучну кристалізацію і

тоді охолоджують з швидкістю  $0,3^{\circ}\text{C}$  за хвилину до  $-36^{\circ}\text{C}$ , а далі з швидкістю  $0,1^{\circ}\text{C}$  за хвилину до  $-60^{\circ}\text{C}$  і переносять в рідкий азот, температура  $-196^{\circ}\text{C}$ .

При швидкому заморожуванні охолоджують ембріон від  $20^{\circ}\text{C}$  до  $-7^{\circ}\text{C}$  з швидкістю  $1^{\circ}\text{C}$  за хвилину, викликають штучну кристалізацію і охолоджують далі з швидкістю  $0,3^{\circ}\text{C}$  за хвилину тільки до  $-30^{\circ}\text{C}$ , після чого переносять ембріон в рідкий азот.

**Вітрифікація.** Значним спрощенням процедури кріоконсервування ембріонів ссавців є метод вітрифікації, що легкий у застосуванні, швидко використовується, не потребує контролю зміни температур. Головною властивістю вітрифікаційної суміші є висока концентрація проникаючих (внутрішніх) криопротекторів, що за низької температури стають желеподібними і в результаті застигають у склоподібній формі.

При цьому не утворюються кристали криги, які є однією із головних проблем руйнування клітин у процесі кріоконсервації. Хоча одержані поза організмом ембріони великої рогатої худоби мають підвищену чутливість до заморожування-відтаювання, вітрифікація може забезпечити кращу виживаність, ніж програмне заморожування. Недоліком цього методу є токсичність криопротекторів, що входять до вітрифікаційного розчину, внаслідок їх високих концентрацій під час еквілібрації, яка необхідна для проникнення криопротектора в клітини і запобігання формування внутрішньоклітинної криги. Порівнюючи токсичність різних внутрішніх криопротекторів за дії на морули мишей, доведено, що етиленгліколь є найменш токсичним (98% виживаності *in vitro*), більша токсичність спостерігалася для гліцерину – 88%, для ДМСО – 68%, для пропіленгліколю – 16%.

Для проникаючих агентів важливою характеристикою є їх здатність до швидкого проникнення агента, що може забезпечити менш тривалу еквілібрацію, дифузія води із клітини пройде швидко і, таким чином, зменшиться ризик осмотичних пошкоджень і токсичного впливу на клітини. Серед розглянутих криопротекторів кращим за проникністю є етиленгліколь.

До вітрифікаційних розчинів додають і непроникаючі (зовнішні) агенти, які мають значний осмотичний ефекти. Серед них найчастіше використовується сахароза.

### **3. Розморожування ембріонів.**

#### **Повільне розморожування**

Розморожують ембріони в спиртовій бані – скляній циліндричній колбі з температурою  $-50\text{ }^{\circ}\text{C}$ , куди поміщають пробірки чи ампули з ембріонами і розморожують зі швидкістю  $4\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{хв.}$  до  $10\text{ }^{\circ}\text{C}$ , після чого переносять на 5 хв. у водяну баню з температурою  $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Нарешті, переносять ембріони в середовище для видалення кріопротектора.

#### **Швидке розморожування**

Розморожують ембріони у водяній бані з температурою  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  протягом 30 сек. зі швидкістю  $3,0\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{хв.}$



## Лекція № 6 «Отримання ембріонів in vitro»

План:

1. Методи отримання ооцитів та їх короткочасне зберігання.
2. Культивування ооцит-кумулюсних комплексів до стадії мейозу in vitro.
3. Підготовка сперми до запліднення in vitro. Капацітація сперми.
4. Запліднення яйцеклітини.
5. Культивування in vitro ооцитів, зигот та ранніх ембріонів.

### 1. Методи отримання ооцитів та їх короткочасне зберігання.

Запліднення in vitro дозрілих у культуральному середовищі ооцитів, вилучених з яєчників забитих тварин, є ефективним способом одержання ембріонів великої рогатої худоби. Удосконалювання методів культивування ооцитів і ранніх ембріонів, запліднення in vitro дозволили досягти прогресу в виведенні телят з ембріонів, одержаних in vitro. Отримані поза організмом бластоцисти великої рогатої худоби можна кріоконсервувати. Пересадження таких ембріонів після розморожування дозволяє одержати нащадків.

Прикладне значення методів дозрівання і запліднення ооцитів in vitro полягає в одержанні додаткової кількості дешевих ембріонів, насамперед, в одноплідних тварин. Ці методи дозволяють:

- по-перше, отримувати ембріони від високоцінних донорів, що не реагують або слабо реагують на гормональну обробку;
- по-друге, використовувати генетичний потенціал видатних за племінними і продуктивними якостями тварин після їх вибракування за віком або з інших причин;
- по-третє, збільшити поголів'я нащадків, наприклад, шляхом підсадження отриманих поза організмом морул і бластоцист низькопродуктивним реципієнтам, зокрема, для виробництва дешевої яловичини.

Останнім часом розроблений метод щотижневого (двічі на тиждень протягом не менше 5 місяців) виймання незрілих ооцитів з яєчників

генетично цінних живих корів шляхом трансвагінальної пункції антральних фолікулів під контролем ультразвуку (OPU – ovum pick-up) без попередньої гормональної обробки донорів (у середньому до 13 якісних ооцитів на тиждень від тварини). Ця методика в сполученні з методами дозрівання і запліднення ооцитів *in vitro*, культивування ембріонів *in vitro* до стадії морулибластоцисти, дозволяє протягом 6 місяців одержати в 4 рази більше придатних для нехірургічної трансплантації морул-бластоцист від одного донора порівняно із стандартною методикою одержання морул-бластоцист *in vivo* на 6...8-й день після штучного запліднення гормонально-оброблених корів-донорів, і не позначається негативно на відтворних якостях донорів ооцитів, у тому числі на стані яєчника і піхви, здатності тварин до виношування плоду.

Ооцити і отримані *in vitro* зиготи великої рогатої худоби можна кріоконсервувати, що дозволяє здійснювати наступні маніпуляції з клітинами в найбільш зручний для проведення експериментів час, а також створити кріобанк ооцитів різних порід худоби, що, поряд із спермобанком і ембріобанком, буде істотним внеском у збереження рідких і зникаючих порід худоби.

Дослідження дозрівання і запліднення ооцитів сільськогосподарських тварин поза організмом можуть бути основою для розробки і впровадження методів клітинної і генетичної інженерії у тваринництві. Так, недавніми дослідженнями було показано, що ембріони великої рогатої худоби, отримані *in vitro*, можна використовувати для клонування шляхом пересадження ядер ембріонів в ооцити, що дозріли *in vitro*.

Розробка системи запліднення і забезпечення ранніх стадій розвитку ембріонів ссавців поза організмом тварини (*in vitro*) має величезне значення у вирішенні ряду наукових завдань і практичних питань, спрямованих на підвищення ефективності розведення тварин.

Система запліднення *in vitro* може бути використана, насамперед, як цінний аналітичний інструмент для вивчення біохімічних і фізіологічних

факторів, що включаються в процес запліднення, з'єднання чоловічої і жіночої гамет. Тільки з освоєнням техніки запліднення поза організмом з'явилася реальна можливість для широкого розповсюдження досліджень з генної і клітинної інженерії й особливо сільськогосподарських тварин. З цією метою необхідні ембріони на ранніх стадіях розвитку, які можна вилучити тільки з хірургічним методом з яйцепроводів, що є трудомістким процесом і не дає достатнього числа зародків для проведення роботи. До того ж, методи гормональної регуляції відтворної функції в сільськогосподарських тварин, що існують, не дозволяють досягти високої точності контролю часу овуляції і внаслідок цього одержати достатнє число ембріонів на бажаній стадії розвитку. Методи клітинної і генної інженерії тварин передбачають також проведення тривалих маніпуляцій з гаметами і ембріонами поза організмом. Усі ці проблеми значною мірою можуть бути вирішені з використанням системи запліднення яйцеклітин ссавців поза організмом.

Запліднення яйцеклітин ссавців *in vitro* відбувається за таких основних етапів: дозрівання ооцитів, капацитація сперматозоїдів, запліднення і забезпечення ранніх стадій розвитку ембріонів.

## **2. Культивування ооцит-кумулюсних комплексів до стадії мейозу *in vitro*.**

Велика кількість статевих клітин у яєчниках ссавців, зокрема у великої рогатої худоби, овець і свиней з високим генетичним потенціалом, має відтворну здатність цих тварин прискорювати генетичний прогрес, порівняно з використанням можливостей нормальної овуляції. У цих видів тварин, як й інших ссавців, число ооцитів, які овулюють спонтанно під час охоти, становить тільки незначну частину від тисяч ооцитів, що знаходяться в яєчнику при народженні тварини. Інші ооцити регенерують усередині яєчника або, як кажуть, піддаються атрезії. Тому виникло питання, чи не можливо вилучити ооцити з яєчників шляхом відповідної обробки і провести їх подальше запліднення поза організмом тварини. У даний час не розроблено методів використання всього запасу ооцитів у яєчниках тварин,

але значне число ооцитів може бути отримане з порожнини фолікулів для подальшого їх дозрівання і запліднення поза організмом.

Хоча більшість ооцитів, вилучених із фолікулів яєчників, відновлюють мейоз і досягають метафази II, їх запліднення часто не забезпечує повноцінного розвитку зародків. Припускають, що основною причиною цього є неповноцінне дозрівання ооцитів.

Однією з причин може бути те, що за дозрівання ооциту *in vitro* у цитоплазмі не виробляється в достатній мері фактор, що контролює формування і розвиток чоловічого пронуклеуса. Вважають, що для появи в цитоплазмі ооциту фактора, що викликає дозрівання чоловічого пронуклеуса, необхідно забезпечити індуктивний вплив нормального оточення ооциту в фолікулі протягом не менше 6 год. після початку мейотичного дозрівання.

Це було підтверджено в досліджах по заплідненню *in vitro* ооцитів свиней, витягнутих з фолікулів на різних стадіях мейозу. Установлено, що стероїдні гормони не потрібні для запуску мейозу в ссавців, але необхідні для повного фізіологічного дозрівання ооциту.

У зв'язку з тим, що стероїдні гормони й інші фактори, які вироблюються фолікулярними клітками, впливають на дозрівання ооцитів, було зроблено припущення, що культивування ооцитів з фолікулярними клітинами може підвищити їх здатність до нормального запліднення і наступного ембріонального розвитку. Багато явищ усередині фолікула, включаючи біосинтез стероїдів і синтез білків, регулюються гонадотропними гормонами. Тому, за культивування ооцитів усередині фолікулів або з фолікулярними клітинами, гонадотропіни повинні бути обов'язковою складовою частиною середовища.

Необхідність прямого контакту між соматичними (фолікулярними) клітинами і статевими клітинами обумовлена рядом причин. Фолікулярні клітини відіграють важливу роль у живленні ооциту. Вони забезпечують енергетичний субстрат ооциту, беруть участь у перенесенні деяких попередників амінокислот, нуклеотидів і фосфоліпідів в ооцит, генерують

інструктивні сигнали, що впливають на ядро і прямий синтез визначених структурних білків. Інструктивні сигнали, що необхідні для дозрівання ооцитів, найбільш важливі в перші 6...8 год. після ініціації.

Незважаючи на низький вихід ооцитів, за кожного витягу, можливість багаторазового використання тварини, з урахуванням інформації про походження отриманих ооцитів, відкриває нові перспективи застосування методу запліднення *in vitro* у практичних цілях.

### **3. Підготовка сперми до запліднення *in vitro*. Капацитація сперми.**

Важливим етапом у розробці методу запліднення в ссавців було відкриття явища капацитації сперміїв. У 1951 р. М.К. Чанг і одночасно з ним Г.Р. Аустин установили, що запліднення в ссавців настає тільки в тому випадку, якщо спермії протягом декількох годин до овуляції знаходяться в яйцепроводі тварини. Ґрунтуючись на спостереженнях щодо вивчення проникнення сперміїв у яйцеклітини пацюка в різні терміни після парування, Аустин увів термін капацитація. Він означає, що в сперміях повинні відбутися деякі фізіологічні зміни до того, як він набуде здатності до запліднення.

Капацитація включає початкову зміну мембрани спермія, що дозволяє йому пройти другу фазу (акросомну реакцію). В даний час першу фазу позначають як власне капацитацію, а другу – як акросомну реакцію.

Розроблено кілька методів капацитації еякульованих сперміїв домашніх тварин. Для видалення білків з поверхні сперміїв, які, очевидно, гальмують їх капацитацію, було використано середовище з високою йонною силою.

Найбільш ефективним способом видалення сім'яної плазми бугаїв і розріджувача в дослідженні запліднення *in vitro* є центрифугування, режими якого можуть бути різними. Для звільнення від плазми і розріджувача, також, застосовують метод *swim-up*, його суть у спливанні сперміїв з активним поступальним рухом із дна пробірки в поверхневий шар чистого середовища,

що дозволяє не лише здійснити капацитацію, а і відбирати найбільш життєздатні гамети. Іншим ефективним методом відбору сперміїв бугаїв з високою рухливістю для запліднення *in vitro* є їх розподіл у градієнтах перколу.

Ефективним способом прискорення капацитації сперміїв бугаїв є їх обробка розчином з високою іонною силою (380...390 мОсм/кг), що характеризується підвищеною концентрацією хлориду натрію. Після обробки сперміїв середовищем з високою йонною силою, їх відмивають від цього середовища центрифугуванням й інкубують протягом певного часу в ізотонічному середовищі для докапацитації.

Капацитацію сперміїв бугаїв можливо індукувати за допомогою фолікулярної рідини корови; теплова обробка фолікулярною рідиною за температури 56°C дозволяє запобігти згортанню білків і уникнути злипання чоловічих гамет.

Відомо, що рідина яйцепроводів корів і теличок, що в стані охоти, викликає капацитацію сперміїв бугаїв. Запліднення *in vitro* дозрілих поза організмом ооцитів корів сперміями бугая, преінкубованими в середовищі з 25% еструсною рідиною яйцепроводів теличок, призвело до penetрації (проникнення сперміїв у яйцеклітину) 70% ооцитів, у той час як у контролі (преінкубація сперміїв у середовищі без рідини яйцепроводів) – було отримано penetрацію лише 1% ооцитів.

На ефективність капацитації сперматозоїдів і запліднення яйцеклітин *in vitro* впливає також рН середовища. У свиней і овець зареєстрований найвищий відсоток penetрації за капацитації сперміїв кнурів у середовищі з рН 7,8 перед додаванням до середовища запліднення з рН 7,4. Для великої рогатої худоби – навпаки, рН середовища 7,4 є оптимальним для капацитації сперміїв, а рН 7,8 – для запліднення ооцитів.

Важливим фактором, що впливає на запліднення *in vitro* дозрілих поза організмом яйцеклітин корів, є температура спільної інкубації чоловічих і жіночих гамет. Зазначимо, що ефективність запліднення залежить від

температури дозрівання ооцитів – частіше запліднювалися ооцити, які дозріли *in vitro* за температури 39°C, ніж ооцити, що дозріли за більш низької температури.

Однак, найбільшого визнання дістав спосіб капацитації сперміїв з використанням гепарину. Пайєти з замороженою спермою бугая відтаюють у водяній бані за температури 39°C протягом 30...40 сек. Після 15 хв. інкубації з гепарином (200 мкг/мол) суспензію розріджують до концентрації 50 мільйонів сперматозоїдів у мол.

Використовуючи прийом багаторазової зміни середовища, можна в кілька разів збільшити ефективність використання однієї порції еякуляту, що особливо важливо при застосуванні сперми від високоцінних бугаїв-запліднювачів.

#### **4. Запліднення яйцеклітини.**

Запліднення яйцеклітин у ссавців здійснюється в яйцепроводах. Це ускладнює доступ дослідника до вивчення умов середовища, у якому відбувається процес запліднення. Тому система запліднення *in vitro* була б цінним аналітичним інструментом для вивчення біохімічних і фізіологічних факторів, що включаються в процес успішного з'єднання гамет. Більш того, передбачалося, що ця система знайде застосування в технології розведення тварин.

За проведення дослідів щодо запліднення *in vitro* велике значення має концентрація сперміїв під час його виконання. Так, при заплідненні *in vitro* дозрілих поза організмом ооцитів корів суспензіями сперміїв з різною концентрацією чоловічих гамет (0,125...4,0×10<sup>6</sup> Сп/мол) найбільша кількість пенетрованих ооцитів спостерігалася за концентрації 1,0×10<sup>6</sup> Сп/мол.

Запліднюваність *in vitro* яйцеклітин тварин залежить також від тривалості спільної інкубації зі сперміями. За спільною інкубацією чоловічих і жіночих гамет великої рогатої худоби протягом 6, 12, 24 або 48 годин

найвищий відсоток дроблення був отриманий після 24-годинного запліднення.

Значний інтерес викликають дослідження щодо пошуку нових технологій одержання ембріонів *in vitro*.

Пенетрація яйцеклітин може бути полегшена ін'єкцією в них сперміїв за допомогою заточеної мікропіпетки. Як показали експерименти на кролях, такі яйцеклітини можуть нормально розвиватися *in vitro* до стадії бластоцисти, а пересаджування їх реципієнтам призводить до народження нащадків. Основною проблемою при цьому є загибель багатьох яйцеклітин через ушкодження в процесі мікроін'єкції. Однак, цей спосіб запліднення жіночих гамет, за якого капациація і акросомна реакція сперміїв не є необхідними, має ту перевагу, що дозволяє використовувати для запліднення не тільки нормальні, а й нерухомі, мертві, дефектні спермії або їх голівки. Було здійснено успішну спробу запліднення *in vitro* ооцитів корів шляхом ін'єкції в їх цитоплазму сперміїв (по одному в кожену яйцеклітину), що вважалися біологічно мертвими через втрату рухової активності після заморожування-відтаювання. При трансплантації морул і бластоцист, отриманих *in vitro* із запліднених цим методом яйцеклітин, було отримано телят. Крім того, ін'єкція сперміїв у ооплазму (метод ICSI) може підвищити ефективність використання способу розподілу чоловічих гамет на X- і Y-спермії за допомогою проточної цитометрії, результатом якої є невисока концентрація і знижена життєздатність відібраних у такий спосіб сперміїв.

Є також методи мікрomanipуляцій з дозрілими ооцитами тварин, засновані на порушенні цілісності їх прозорої оболонки з наступним перенесенням жіночих гамет у суспензію капацитованих сперміїв. Вони полягають у проколюванні (або просвердлюванні) прозорої оболонки або її механічному частковому розсіченні (*partial zona dissection – PZD*). Проколювання оболонки здійснюють за допомогою мікроголки, просвердлювання – під впливом кислого розчину (наприклад, розчину Тиріде, рН 2...3), що виділяється з кінчика мікропіпетки.



## 5. Культивування *in vitro* ооцитів, зигот та ранніх ембріонів.

Культивування ембріонів *in vitro* у культуральному середовищі є найбільш простим і дешевим способом їх розвитку до морулибластоцисти. Подолання блокування дроблення ембріонів великої рогатої худоби *in vitro* потребує наявності в середовищі культивування біологічно активного компонента, який вироблюється деякими клітинними системами.

Установлено, що система моношару ендометріальних фібробластів добре підходить для культивування розділених ембріонів великої рогатої худоби. Про сприятливий вплив трофобластичних пухирців 13,5-денних ембріонів великої рогатої худоби на розвиток інтактних і розділених на половинки 8...16-клітинних ембріонів великої рогатої худоби повідомили Р. Роурі й ін. Додавання до середовища культивування маточних факторів – фібронектину і гепарину – сприяло розвитку 36% ембріонів великої рогатої худоби до 16-клітинної і більш пізніх стадій розвитку. На можливість використання амніотичної порожнини ембріона курчати для розвитку ембріонів великої рогатої худоби до стадії морулибластоцисти вказують Блейквуд й ін. До числа найбільш ефективних клітинних систем, які використовують для культивування ембріонів великої рогатої худоби, відносяться моношар епітеліальних клітин яйцепроводу і моношар клітин гранулези корів.

Культивування запліднених яйцеклітин корів може здійснюватися також без прямого контакту з моношаром епітеліальних кліток яйцепроводів корів. Наприклад,

Здатність моношару епітеліальних клітин яйцепроводів корів до підтримки розвитку ембріонів великої рогатої худоби *in vitro* до стадії бластоцисти пов'язана із секрецією клітин моношару в середовище культивування білків з різною молекулярною вагою. Встановлено, що низькомолекулярний білок, який секретується моношаром епітеліальних клітин яйцепроводів корів (< 10 кда), як і фетальна сироватка теляти, впливає

на перші розподіли дроблення ембріонів великої рогатої худоби *in vitro* до 8-клітинної стадії, а білок (білки) з більш високою молекулярною вагою ( $> 10$  кДа) сприяє розвитку ембріонів від 8-клітинної стадії до стадії бластоцисти.

Установлено позитивний вплив різних факторів росту на розвиток ембріонів поза організмом. Фактори росту продукуються як самим ембріоном (аутокринні), так і, наприклад, епітелієм яйцепроводів і матки (паракринні). Так, додавання в середовище культивування ембріонів інсулінподібного фактора росту (ІФР) або епідермального фактора росту (ЕФР) сприяє розвитку ембріонів великої рогатої худоби до стадії бластоцисти. ІФР та інсулін сприяють дробленню і компактизації ембріонів, формуванню бластоцисти, стимулюють синтез білка в трофоектодерме (ТЕ) і внутрішньоклітинній масі (ВКМ), тим часом як ЕФР, ефективний у період розвитку від морули до бластоцисти, стимулює синтез білка в ТЕ; тромбоцитарний фактор росту сприяє розвитку ембріонів великої рогатої худоби в середовищі без сироватки до і після 8-клітинної стадії. Фактор росту, що трансформує (ТФР), і основний фактор росту фібробластів сприяють формуванню бластоцисти; крім того, ТФР стимулює поглинання ембріоном амінокислот і сприяє експансії бластоцилі.

## Лекція № 7 «Клонування ембріонів тварин»

План:

1. Отримання клонів на основі зигот та яйцеклітин.
2. Методи пересадження ядер соматичних та ембріональних клітин.
3. Отримання монозиготних диплоїдних, партеногенетичних ембріонів.
4. Близнята. Монозиготні і гетерозиготні двійнята та методи їх отримання.

### **1. Отримання клонів на основі зигот та яйцеклітин.**

Отримання клітин-реципієнтів – це один із перших етапів цієї методики. У якості клітин-реципієнтів використовують або зрілі ооцити на стадії метафази II, тобто яйцеклітини, або зиготи. На початку досліджень з клонування тварин клітинами-реципієнтами були одержані *in vivo* яйцеклітини, зиготи або двоклітинні ембріони. Нині при цьому використовують ооцити, що дозрівають в умовах *in vitro*. Вибір клітин-реципієнтів є досить суттєвим моментом клонування, тож слід враховувати фізіологічні процеси, що відбуваються під час клітинного циклу. Внаслідок проведених експериментальних робіт та аналізу клітинного циклу встановлено, що для отримання клітин-реципієнтів ядер краще використовувати яйцеклітини, ніж зиготи. Для їх отримання потрібно менше часу, менше препаратів і реактивів. Крім того, через непрозорість цитоплазми зигот великої рогатої худоби виникає необхідність центрифугувати зародки, а це зменшує їх життєздатність. До того ж, виходячи з гіпотези про ремоделюючі/репрограмуючі фактори, цитоплазма яйцеклітин здатна репрограмувати дію ядра клітини-донора, а цитоплазма зиготи – ні.

Перші досліді з мікроманіпуляцій показали, що безпосереднє введення піпетки з пронуклеусом або ядром бластомера, що міститься в ній, в ооплазму зиготи або яйцеклітини ссавців викликає незворотні ушкодження

плазматичної мембрани реконструйованої зиготи та її загибель через великі розміри ін'єкційної піпетки.

Для полегшення введення бластомерів у перивітеліновий простір ооцитів, жіночі гамети дозволяється попередньо поміщати до гіпертонічного середовища.

Уведення ядра або пронуклеуса під прозору оболонку в перивітеліновий простір, як правило, не призводить до злиття каріопласту з плазматичною мембраною яйцеклітини або зиготи без застосування спеціальних фузогенів – інактивованого вірусу Сендай, поліетиленгліколю (ПЕГ) або електричного струму. ПЕГ широко використовується за роботи з рослинними і соматичними клітинами, однак, у дослідженнях на ембріонах звичайно не застосовується через варіабельність активності, сильно виражену токсичну дію на клітини, складність його видалення з плазматичної мембрани, що викликає лізис клітин і перешкоджає розвитку ембріонів. Більш вдалим у цьому відношенні є вірус Сендай. Але і він має ряд недоліків, що обмежують його застосування для роботи з ембріонами. До них відносяться ризик збереження вірулентності вірусних часток, варіабельність властивостей різних партій, низька, на відміну від його використання за злиття каріопластів яйцеклітин і бластомерів ранніх ембріонів, ефективність для клітин більш пізніх ембріонів. Крім того, бластомери ембріона отримані злиттям каріопласта з яйцеклітиною, вже не можуть бути використані як донори ядер, оскільки повторне застосування цього фузогена неможливе внаслідок втрати клітинних рецепторів, що відповідають за зв'язування з вірусом. Найбільш ефективним фузогеном для ембріонів ссавців є електричний струм. За його допомогою можливо, здійснюючи серійні пересадження ядер, установлювати стабільні, але легко заміняємі залежно від бажання експериментатора, параметри електричного впливу – силу струму, тривалість впливу і число імпульсів.

## 2. Методи пересадження ядер соматичних та ембріональних клітин.

Залежно від типу клітин-донорів генетичного матеріалу можна умовно виділити декілька типів клонування. Якщо донорами ядер є ранні зародки, то ми маємо так зване ембріональне клонування. До ембріонального клонування можна віднести і таке, коли донорами ядер є ембріональні стовбурні клітини (ЕСК), але цей тип відрізняється від першого можливістю маніпулювати великою кількістю клітин, які, крім того, можна розмножувати шляхом культивування поза організмом.

Клонування ембріонів шляхом пересадження ядра має три основних етапи: отримання клітин-реципієнтів, виділення інтактного ядра донора, пересадження ядра в енуклеювану яйцеклітину. На відміну від амфібій пересадження ядра в ссавців не стимулює ооцит. Тому потрібно четвертий етап – активація ооциту і злиття мембран яйця й ооциту. Під дією електричного імпульсу відбувається активація ооциту і злиття мембран між ядром клітини донора і енуклеюваним ооцитом-реципієнтом. Технологія пересадження ядер клітини сприяла успішному одержанню клонованих живих кроликів, мишей, овець, кіз, великої рогатої худоби і свиней.

Перші досліди з мікроманіпуляцій показали, що безпосереднє введення піпетки з пронуклеусом або ядром бластомера, що міститься в ній, в ооплазму зиготи або яйцеклітини ссавців викликає незворотні ушкодження плазматичної мембрани реконструйованої зиготи та її загибель через великі розміри ін'єкційної піпетки.

Для полегшення введення бластомерів у перивителиновий простір ооцитів жіночі гамети дозволяється попередньо поміщати до гіпертонічного середовища. Пересадження ізольованих поодиноких бластомерів 8-, 16- і 32-клітинних ембріонів кроля в енуклеювані ооцити, поміщені за 2-3 хвилини перед мікроманіпуляціями в 0,5 М розчину сахарози в розчині *PBS*, і

наступне електрозлиття привели до розвитку 22,18 і 15% реконструйованих яйцеклітин відповідно до стадії морули-бластоцисти.

Уведення ядра або пронуклеусу під прозору оболонку в перивителіновий простір, як правило, не призводить до злиття каріопласту з плазматичною мембраною яйцеклітини або зиготи без застосування спеціальних фузогенів – інактивованого вірусу Сендай, поліетиленгліколю (ПЕГ) або електричного струму. ПЕГ широко використовується за роботи з рослинними і соматичними клітинами, однак, у дослідженнях на ембріонах звичайно не застосовується через варіабельність активності, сильно вираженої токсичної дії на клітини, складність його видалення з плазматичної мембрани, що викликає лізис клітин і перешкоджає розвитку ембріонів. Більш вдалим у цьому відношенні є вірус Сендай. Але і він має ряд недоліків, що обмежують його застосування за роботи з ембріонами. До них відносяться ризик збереження вірулентності вірусних часток, варіабельність властивостей різних партій, низька, на відміну від його використання за злиття каріопластів яйцеклітин і бластомерів ранніх ембріонів, ефективність для клітин більш пізніх ембріонів. Крім того, бластомери ембріона отримані злиттям каріопласта з яйцеклітиною, вже не можуть бути використані як донори ядер, оскільки повторне застосування цього фузогена неможливе внаслідок втрати клітинних рецепторів, що відповідають за зв'язування з вірусом. Найбільш ефективним фузогеном для ембріонів ссавців є електричний струм. За його допомогою можливо здійснюючі серійні пересадження ядер, установлювати стабільні, але легко заміняємі залежно від бажання експериментатора параметри електричного впливу – силу струму, тривалість впливу і число імпульсів.

Додатковим джерелом ядер можуть стати ембріональні стовбурні клітини (ЕСК). Вирішення цієї проблеми дозволить, як очікується, одержувати велику кількість ідентичних нащадків.

ЕСК мають нормальний каріотип, лінії цих клітин можна зберігати в недиференційованому стані в культурі від 3-х місяців до року, заморожувати

і відтаювати кілька разів без істотного зниження їх здатності до розвитку. Іншою перевагою ЕСК є те, що вони можуть бути отримані від ліній тварин, що несуть рецесивні летальні мутації або від партеногенетичних ембріонів. ЕСК не диференційовані і після утворення химерних ембріонів з них і звичайних морул або бластоцист можуть брати участь у формуванні різних органів, у тому числі клітин зародкової лінії. Оскільки ЕСК можна генетично трансформувати, з їх допомогою можливе створення трансгенних тварин. ЕСК можуть, імовірно, формувати повноцінний ембріон. Нещодавно проведені на мишах експерименти підтвердили це припущення, показавши принципову можливість злиття ЕСК з енуклеюваними ооцитами і одержання реконструйованих ембріонів.

Пересадження ядер ембріональних стовбурних клітин, отриманих від ВКМ (внутрішньоклітинна маса) бластоцист і морул великої рогатої худоби, шляхом електрозлиття ЕСК (діаметр стовбурних клітин дорівнює 15-22 мкм) з енуклеюваними ооцитами корів, що дозріли *in vitro*, дозволило одержати клони ембріонів на стадії бластоцисти, пересадження яких реципієнтам призвело до одержання трьох 38-45-денних плодів. Не було встановлено змін морфологічних характеристик ЕС-клітини протягом понад 12-місячного культивування клітин *in vitro*; показана здатність ліній ЕСК до спонтанного диференціювання в ембріодні тіла і ендодермоподібні клітини.

Принципово вищим ступенем клонування є так зване *соматичне клонування*, коли донорами ядер є соматичні клітини дорослого організму. Якщо в перших двох типах клонування можливо отримати копії ембріона і невідомо, які властивості матимуть тварини з цих зародків, то в останньому - копіюється існуючий дорослий організм. Отримання генетичних копій тварин відкриває неймовірні перспективи як для науки, так і для виробництва, але її реалізація соматичного клонування набагато складніша. Це викликано ступенем диференціації генетичного матеріалу клітин, що є донорами ядер для пересадок. Якщо на ранніх стадіях розвитку ембріону (2-4 клітини) всі бластомери є тотипотентними і кожен з них може дати початок

новому зародку, то на більш пізніх стадіях ембріогенезу це вже неможливо. Ядра 8-32- клітинних зародків уже диференційовані, але ступінь їх спеціалізації ще не високий, і вони здатні активізуватися в цитоплазмі енуклеюваної яйцеклітини, а створений ядерно-цитоплазматичний гібрид спроможний розвинути в повноцінний зародок. Більш високий ступінь диференціації ембріональних стовбурних клітин, які отримують з внутрішньоклітинної маси бластоцисти, робить завдання реконструювання ембріону з їх ядер ще важчою. Набагато складніше завдання активізувати ядра глибоко диференційованих соматичних клітин. Теоретично це можливо тільки в тому разі, якщо соматична клітина буде на певній стадії мітозу – коли вона не виконує відповідні функції в організмі, а розмножується, тобто певною мірою схожа на ембріональну клітину.

Таким чином, у наш час можливо розглядати як науковий напрямок з певними досягненнями тільки клонування ембріональне. І хоча з загальнобіологічної точки зору соматичне і ембріональне клонування суттєво відрізняються, з погляду на використання цього методу в народному господарстві, зокрема в тваринництві чи фармацевтичній промисловості, різниця між ними може бути невеликою.

### **3. Отримання партеногенетичних ембріонів.**

Під партеногенезом розуміють розвиток ембріона з жіночої гаметі без участі чоловічої статевої клітини, тобто партеногенетичні особини в хромосомах містять тільки гени матері. Таким чином, партеногенез приймає форму безстатевого розмноження у тварин зі статевим способом відтворення.

Розрізняють диплоїдну і гаплоїдну форми партеногенезу. За диплоїдного партеногенезу мейоз (тобто редукції числа хромосом) не відбувається, або диплоїдний набір хромосом відновлюється. Відомі два механізми диплоїзації партеногенезу: амейотичний і мейотичний.

Селекція на підвищення частоти природного партеногенезу виявилася ефективною. У результаті цілеспрямованої селекції частка



партеногенетичних яєць, що розвиваються, досягла 42%. Було помічено, що за відсутності відбору лише в поодиноких випадках партеногенетичний розвиток проходить до вилуплення пташенят партеногенів. За здійснення селекції відсоток ембріонів, що розвиваються до пізніх стадій інкубації, зростає.

На базі сучасної біотехнології можуть бути розроблені ефективні методи, що викликають штучний партеногенез шляхом стимуляції партеногенетичного розвитку яйцеклітини. Найбільший інтерес викликає індукований партеногенез у ссавців. Однак, у цього класу тварин це пов'язано з великими труднощами через особливості оогенезу. Справа в тому, що у ссавців, як правило, яйцеклітини овулюють на стадії метафази II. Тому партеногенетичному розвитку можуть бути піддані лише зрілі ооцити. Лише у 70-і роки, з розробкою методів культивування й запліднення фолікулярних ооцитів *in vitro*, почалися широкі дослідження стимуляції партеногенезу в ссавців, у тому числі у великої рогатої худоби. Як стимулятори, що викликають партеногенетичний розвиток яйцеклітини, використовують механічні, фізичні, хімічні й біологічні фактори.

У наш час випробувано багато агентів, здатних активувати яйцеклітини ссавців до партеногенетичного розвитку. Як стимулятори використовують механічні впливи, тепловий, електричний або осмотичний шок, ферменти (гіалуронідаза, трипсин, проназа), двовалентні катіони, антисептики (етанол, дибукаїн, тетракаїн, лигнокаїн, прокаїн), фенотіазинові транквілізатори, інгібітори синтезу білків.

Стимуляція електричним або температурним шоком є найбільш ефективною як *in vitro*, так і *in vivo*. Електричний струм активує до партеногенезу близько 3/4 свіжоовульованих яйцеклітин, 90% з яких досягає стадії морули або бластоцисти. Температурні впливи стимулюють до 90...100% яйцеклітин. При застосуванні осмотичного шоку активованих яйцеклітин було значно менше – 38...58%.

Є передумови одержання партеногенів і на більш ранніх стадіях стимуляції яйцеклітини ссавців. Цей підхід можливий в умовах культивування ооцитів *in vitro*. Виділені з яєчників ооцити можна культивувати до стадій метафази I і метафази II, після чого їх стимулюють до партеногенетичного розвитку з наступним культивуванням і трансплантацією реципієнтам.

Ооцити, що є на різних стадіях мейотичного дозрівання, стимулювалися до партеногенетичного розвитку холодним шоком за температури 0...4°C протягом 15...36 хв. Потім клітини прогрівали протягом 5 хв. за температури 37,5°C у звичайному середовищі культивування. Після прогрівання ооцити культивувалися у звичайних середовищах. Тривалість культивування ооцитів і зародків – 69...73 год.

Стимуляція партеногенетичного розвитку дає можливість у перспективі одержувати величезну кількість гомозиготного або одноманітного за генотипом потомства. Це дозволить у найкоротший термін різко підвищити продуктивність тварин і одержувати особин бажаної статі. Створення черід із клонованих тварин буде сприяти розвитку промислового тваринництва. Тварин одного генотипу можна утримувати на однаковому раціоні, непотрібно здійснювати селекцію за екстер'єром, реакціями поведінки, вименем й іншими ознаками. Полегшується розробка питань машинного доїння, норм годівлі. Створений доїльний апарат для однієї корови буде придатним для всіх її генетичних аналогів.

Таким чином, створення клонів тварин можна розглядати як ефективну біотехнологію майбутнього племінного і користувального скотарства.

#### **4. Близнята. Монозиготні і гетерозиготні двійнята та методи їх отримання.**

Як зазначалося, темпи селекційного прогресу сільськогосподарських тварин значною мірою гальмують низькі темпи розмноження. Тому одержання від однієї особини великої кількості нащадків сприяє завданням

селекціонерів щодо створення високопродуктивних стад тварин.

Виведення однойцевих близнюків має велике значення для тваринництва. З одного боку, збільшується вихід телят від одного донора, а з іншого боку – з'являються генетично ідентичні двійні. Одержання їх у великій кількості могло б полегшити оцінку бугаїв за якістю нащадків, зменшити вартість спермопродукції, прискорити й здешевити тестування препаратів і спростити дослідження в галузі годівлі тварин. Генетично ідентичні копії ембріонів і телят можливо успішно застосовувати в дослідженнях з вивчення взаємодії генотип- середовище, зокрема, у таких дослідженнях, як вивчення впливу зовнішнього середовища на розвиток половинок одного ембріона після їх пересадження одному або різним реципієнтам, впливу годівлі і утримання тварин-близнюків на формування їх фенотипів та ін. У селекції також є інтерес до використання монозиготних близнюків для оцінки м'ясних якостей шляхом забою одного близнюка і перенесення отриманих даних на інший. Після розподілу ембріона одну половинку можна кріоконсервувати, а іншу – пересадити реципієнтові. За позитивних результатів оцінки отриманого потомства половинку, що залишилася, можливо буде використовувати в селекційному процесі.

У практиці використовують два способи розподілення ембріонів – перев'язуванням і розрізуванням. У першому разі зародки відбирають за допомогою мікроманіпулятора, не порушуючи прозорої оболонки, потім перев'язують їх синтетичною ниткою діаметром 15 мкм посередині. Розподілені половини окремо дробляться, утворюючи зародки. Ембріони також розрізають ножем навпіл або на більшу кількість частин.

Розподіл ембріонів мікроголкою, на відміну від мікроскальпеля, дає змогу одержувати частини зародків із найменшою кількістю пошкоджень. Це зумовлено тим, що голка не має гострих та ріжучих сторін і під час розподілу зародка на частини вона лише розриває зв'язки між бластомерами, а не розрізає їх як лезо.

Після розподілу ембріона на дві частини, одержані половинки

переносять до термостату і культивують протягом 3-х годин. Якщо за цей час половинки зародків компактизувалися, їх пересаджують реципієнтам без попереднього поміщення в зону пелюциди.

Нещодавно розроблено новий спосіб розподілу ембріонів великої рогатої худоби на половинки шляхом проколювання заточеною мікропіпеткою прозорої оболонки бластоцисти, що розширюється, поблизу внутрішньоклітинної маси (ВКМ) з наступним (через 24 години культивування) відсіканням бластоцисти-половинки, що вилупилася. Таким методом уже отримано дві пари монозиготних телят-близнюків. Даний спосіб, на відміну від звичайного, призводить до дуже малих клітинних витрат за розподілу.

Метод роботи з ембріонами на ранніх стадіях у практиці широко використаний не був, оскільки потребує хірургічного вилучення і трансплантації одержаних бластомерів.

## **Лекція № 8 «Способи одержання химер. Регуляція та способи визначення статі»**

План:

1. Теоретичне і практичне значення химер, одержання химерних ембріонів.
2. Міжпородні та міжвидові химери.
3. Молекулярно-біологічні основи регуляції і визначення статі тварин.
4. Регуляція співвідношення статей шляхом розділення Х-У сперміїв, імуногенетичний метод.
5. Методи визначення статі (цитогенетичний, імунологічний, ДНК-зондів)

### **1. Теоретичне і практичне значення химер, одержання химерних ембріонів.**

Поняття химера (грец. Chimaera) означає складена тварина. У сучасному понятті термін химера використовується головним чином за одержання складених організмів, у яких генетично різні клітинні популяції походять більше, ніж від однієї зиготи або зародка. За класифікацією К. Форда (1969), варто розрізняти первинний химеризм, коли різні клітинні популяції співіснують із моменту запліднення або раннього ембріогенезу, і вторинний, за якого комбінуються тканини від двох і більше дорослих особин або ембріонів після початку глибокої клітинної диференціації. Наприклад, у близнюків великої рогатої худоби спостерігається загальний плацентарний кровообіг і в крові можна виявити вторинний химеризм (Завертяєв Б.П., 1987). Варто відрізняти химер від спонтанно виниклих складених тварин – мозаїків, що походять з однієї заплідненої яйцеклітини.

У цей час одним з перспективних напрямків біотехнології є штучне одержання химер або генетичних мозаїків. Сутність такого біотехнічного методу, заснованого на досягненнях клітинної інженерії і мікрomanipуляцій на ранніх ембріонах, полягає в штучному об'єднанні ембріональних клітин двох і більше тварин, що належать не тільки до однієї породи, а й до різних

порід і навіть видів. Отримані тварини – химери мають ознаки різних генотипів. Сучасна мікрохірургія дозволяє одержувати химер, що мають чотирьох і більше батьків.

Усі дотепер відомі в науці експериментальні химери ссавців створені методами агрегації двох (або більше) генотипічно різнорідних зародків або шляхом мікроін'єкції клітин внутрішньоклітинної маси (ВКМ) бластоцисти донорів у бластоціль ембріона-реципієнта. Перший метод дістав назву агрегаційний, другий – ін'єкційний.

**Агрегаційний метод.** Уперше агрегаційний метод одержання химерних мишей був розроблений А. Tarkowski (1961, 1963) і В. Mintz (1962).

Два ембріони, що розрізняються генотипами на стадії 8...12 бластомерів, обробляють протеолітичним ферментом проназою, вивільняють від зони пелюциду і зближають один з одним у культуральному середовищі. З'єднані ембріони культивують протягом 24...48 год. до завершення агрегації, тобто до утворення бластоцисти. Використають середовище Бринстера в краплях модифікованого розчину Кребса – Рингера з бікарбонатом, а також інші. Отримані таким чином химерні ембріони трансплантують реципієнтній миші. Агрегаційні химери можливо одержувати не тільки між двома ембріонами, а й між різним числом ізольованих бластомерів або окремими частинами ембріонів (Мак-Ларен Е., 1979). При цьому маса химерних ембріонів буває не більше ніж у звичайних, тобто вона підлягає дії механізмів ембріональної регуляції. Перевага агрегаційного методу полягає в тому, що він не потребує втручання мікрохірургічної техніки, що дозволяє широко його використати в ембріогенетиці.

**Ін'єкційний метод.** Ін'єкційний метод, що потребує застосування мікроманіпуляційної техніки й мікрохірургічного втручання, був розроблений Р. Гарднером (1968). За ін'єкційного методу використовують ембріони, що перебувають на стадії бластоцисти. Бластоцисту тримають

усмоктувальною піпеткою й, використовуючи мікроманіпулятори, у трофобласті шляхом проколів голками зони пелюциду роблять отвір, через який ін'єктують ВКМ донорського зародка. Пізніше вдалося встановити, що за цим методом можливо ін'єктувати не тільки ВКМ ранніх ембріонів, а й більш диференційовані клітини. Отриману химерну бластоцисту трансплантують миші-реципієнтови.

Ін'єкційний метод знайшов застосування за одержання міжвидових химер.

Для ідентифікації химерних тварин застосовують ряд маркерів. Як маркерні використовують гени, що контролюють пігментацію, структуру шерсті, антигенні, біохімічні, морфологічні й ін. За одержання химерних тварин, що створюються від фенотипових контрастних порід або видів, широко використовують морфологічні маркери.

## 2. Міжпородні та міжвидові химери.

В останні роки велика увага приділяється одержанню міжвидових і міжпородних химер ссавців. Це особливо важливо в селекції сільськогосподарських тварин, тому що міжвидові або міжпородні химери в одному організмі можуть поєднувати різні господарсько важливі ознаки.

Уперше міжвидові химери були отримані ін'єкційними і агрегаційним методами між двома близькими видами мишей, які звичайно не схрещуються – *M. musculus* і *M. caroli*. У міжвидових химер, отриманих шляхом ін'єкції ВКМ *M. caroli* у бластоцисти *M. musculus* і пересаджених реципієнтам останнього виду, не виявили імуногенетичної несумісності клітин, і їхній розвиток відбувався нормально. Якщо ж міжвидові химери одержували реципрокною ін'єкцією і розвиток зародків відбувався в організмі *M. musculus*, то химери гинули протягом 16 діб після пересадки. Це свідчить про те, що бластоцисти *M. caroli* дегенерують у матці *M. musculus*, в той час як агрегація двох генетично різних зародків забезпечує життєздатність химер.

Уперше міжвидові химерні зародки між мишею і пацюком шляхом агрегації морул було отримано у 70-х роках. У 1973 р. в експерименті з ін'єкції ВКМ пацюка в бластоцисту миші химерні бластоцисти були пересаджені в матку миші, де вони розвивалися до 30 пар сомітів (Gardner R. G., Johnson M., 1973). У подальших дослідках ці автори отримали всі химерні ембріони до середини вагітності й декілька – до народження. Результати досліджень показали вирішальну роль у виживанні ембріонів сумісності трофобласта і матки.

### **3. Молекулярно-біологічні основи регуляції і визначення статі тварин.**

Отримання тварин визначеної статі є не тільки біологічною, а й практичною проблемою. Це особливо важливо для молочної худоби, в якій головна господарсько-корисна ознака – молочна продуктивність – належить до тих, що обмежені статтю. Тому виникає завдання щодо регулювання співвідношення статі, що необхідно для ефективного розведення тварин.

Статеві відмінності стосуються багатьох ознак, але в основі детермінації і диференціації статі у ссавців лежить хромосомна теорія спадковості.

**Детермінація і диференціація статі.** У соматичних клітинах телиці або корови є 58 аутосом і дві Х-хромосоми, а в соматичних клітинах бугая – 58 аутосом, одна Х-хромосома і одна Y-хромосома. Іншими словами, корови мають статеві хромосоми ХХ, бугаї – ХУ. Решта хромосом – аутосоми – у тварин різної статі однакові. Статеві хромосоми відрізняються від аутосом формою, розмірами і структурою. Їх легко ідентифікувати і відокремити від аутосом. У ссавців спадкоємство статі відбувається за типом моногібридного аналізуючого схрещування. Поведінка статевих хромосом під час мейозу є механізмом, що саморегулюється. В процесі тривалої еволюції на основі цього механізму із покоління в покоління у популяціях тварин підтримується співвідношення гамет з Х- і Y хромосомою 1:1, а отже, і співвідношення статі 1:1.



Які статеві хромосоми перейдуть із гамет до зиготи, ознаки такої статі і будуть властиві тварині. Статеві відмінності в каріотипі можуть бути виражені дуже просто: на додаток до основного набору генів, однакового у самців і самок, самці ссавців відрізняються однією унікальною хромосомою Y, властивою лише їм. Проте наявність тільки цієї унікальної хромосоми із 60 хромосом великої рогатої худоби призводить до яскраво вираженого статевого диморфізму, тобто прояву в індивідуумів різної статі, що відносяться до одного виду, добре видимих відмінностей за рядом ознак. Це призводить до суперечності механізму визначення статі: прояв яскраво вираженого статевого диморфізму за незначних генетичних відмінностей між статями.

#### **4. Регуляція співвідношення статей шляхом розділення X-Y спермій, імуногенетичний метод.**

Генетичний механізм визначення статі забезпечує розподіл нащадків за статтю у співвідношенні 1:1. Популяція чоловічих гамет має гетерогенність (XY), а жіночих – гомогенність (XX). На підставі цього можуть бути розроблені методи розділення сперми самців на гамети, що містять X- і Y-хромосоми і, таким чином, з'явиться можливість штучно регулювати співвідношення статі у сільськогосподарських тварин. У цьому разі запліднення яйцеклітин сперматозоїдами з X-хромосомами викликає появу самок, а сперматозоїдами з Y-хромосомами – самців.

Диморфізм спермій самців, що містять різні статеві хромосоми, полягає в тому, що спермії з Y-хромосомами мають меншу масу і величину. У ссавців розміри X-хромосоми звичайно більші порівняно з розмірами Y-хромосоми. Так, середній розмір X-хромосоми великої рогатої худоби складає 6,17 мкм, а у Y-хромосоми – 2,22 мкм. На підставі цього було розроблено різні методи: центрифугування, седиментації (осадження), електрофорезу, фільтрації, цитофлуорометрії, імунологічні та ін.

**Центрифугування і седиментація.** Перша спроба регулювання статі за допомогою центрифугування була зроблена ще у 1925 році, але експеримент не дав позитивних результатів. У 1976 році було проведено центрифугування сперми кроля з використанням градієнта гущини у глюкозо-жовточно-цитратному середовищі із додаванням 12% лактози. Час центрифугування складав 15 хвилин, при 1000 об/хв. за температури 20о С. У результаті осіменіння кролиць спермою з верхньої фракції було отримано 58,6% самців, а з нижньої – 40,1%. Повторне центрифугування сперми не привело до розширення зрушення щодо статі у нащадків.

Виходячи з припущення, що спермії з Х-хромосою через свою більшу масу, будуть швидше осаджуватися, ніж спермії з Y-хромосою, було використано метод седиментації. Осіменіння кролиць спермою з верхньої фракції привело до народження високої долі самців (27:7), а з нижньої фракції – самок (27:11). Однак, спермії бугая цим методом поділити не вдалося.

**Метод фільтрації.** В основу методу покладена різна рухливість сперміїв з різними статевими хромосомами. Так, більш легкі спермії з Y-хромосою володіють більшою рухливістю і швидше проходять через в'язкий шар сироваткового альбуміну бугая (БСА). Була використана вертикальна колонка з трьома шарами, причому концентрація альбуміну збільшувалася зверху вниз. За допомогою забарвлення сперміїв акрихіном було встановлено, що нижня фракція містить до 85% сперміїв із статевої Y-хромосою. Біологічної перевірки методу на самках зроблено не було. Подальші перевірки цього методу мали суперечливі результати. Використання зазначеного методу в 1975 році дало можливість отримати 58,6% бугаїв з 158 телят, що народилися від штучно запліднених сперміями з Y-хромосомами корів.

**Електрофорез.** Уперше припущення щодо різної поведінки сперміїв у магнітному полі зробив біолог М.К Кольцов у 1930 році. Було встановлено, що спермії кролів з Х-хромосомами в процесі електрофорезу спрямовуються

до аноду, спермії з Y-хромосоною – до катоду. У 60-х роках ця гіпотеза була підтверджена отриманням надлишку самок у нащадків кролів після штучного осіменіння анодними сперміями і самців після штучного осіменіння катодними сперміями. Однак, розділення сперми бугаїв на фракції за допомогою електрофорезу не дало позитивного результату і різниця між нащадками різних статей, отриманих за запліднення корів різними фракціями сперми, виявилася статистично невірогідною.

**Використання лазера.** Встановлено, що спермії з X хромосомами містять більше ДНК, ніж спермії з Y-хромосомами, ця різниця для сперми кнурів становить 3,4%, бугаїв – 3,8%, баранів – 4,2%, а позитивні або негативні заряди клітин залежать від кількості ДНК. При використанні лазера спермії спочатку проходили флуоресцентну обробку, після чого їх пропускали через лазерний промінь і під впливом негативно і позитивно заряджених пластин вони відхилялися у відповідний бік. Успішно проведено дослід з розподілу сперміїв кроля з X- і Y-хромосомами.

## **5. Методи визначення статі (цитогенетичний, імунологічний, ДНК-зондів)**

З розвитком методів трансплантації і клонування ембріонів усе більшого значення набуває попередній відбір ембріонів за статтю і особливостям каріотипу. Впровадження методу визначення статі ембріонів перед їх трансплантацією дозволить цілеспрямовано одержувати бугаїв-трансплантантів для племпідприємств, успішно вирішувати ряд інших практичних питань у тваринництві. Наприклад, для розширеного відтворення стада у товарних господарствах, що спеціалізуються на виробництві молока, бажано одержувати теличок, а в товарних господарствах, що спеціалізуються на виробництві яловичини, – бугайців. Упровадження методів ідентифікації статі в доімплантаційних ембріонів дозволить уникнути одержання безплідних теличок-фримартинів за трансплантації реципієнтові двох ембріонів.

З цією метою використовують методи визначення каріотипу зародка (наявність Х- і Y-хромосом) або імуногенетичне визначення наявності спеціальних H-Y-антигенів, що містяться в зародках чоловічої статі.

У наш час стать ембріонів великої рогатої худоби, які є на стадії доімплантаційного розвитку, визначають за допомогою цитогенетичного та імунологічного методів.

**Цитогенетичний метод** визначення статі пізніх (9...14- денних) і ранніх ембріонів великої рогатої худоби заснований на ідентифікації чоловічих і жіночих метафазних статевих хромосом після культивування ембріонів у середовищі з митостатиком.

Методи оцінки пізніх ембріонів, однак, не знайшли значного розповсюдження через суттєве зниження їх приживаності порівняно з ембріонами більш ранніх стадій розвитку (6,5...8-денні). Цитогенетичний метод оцінки ранніх ембріонів, на відміну від інших методів аналізу, дозволяє не тільки визначити їх стать, а й ідентифікувати ряд хромосомних порушень, що, як відомо, є однією з причин загибелі ембріонів, і, таким чином, вирішити питання про доцільність пересадження частини ембріона, що залишилася.

**Імунологічні методи.** Стать ембріонів може бути встановлена ідентифікацією H-Y-антигену за допомогою антитіл до H-Y. Виявлення зв'язування антитіл до H-Y-антигену з чоловічими ембріонами здійснюється двома методами. Характерною рисою першого, більш простого методу, є культивування клітин ембріонів у середовищі з комплементом, що приводить до лізису клітин ембріонів чоловічої статі. Більш практичним є другий метод, що не ушкоджує ембріони, сутність якого полягає в одержанні і використанні вторинних флуоресцентних антитіл до H-Y-антигену. Ефективність цього методу стосовно ембріонів великої рогатої худоби становить 85...87%.

## СПИСОК РЕКОМЕНДОВАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Біотехнологічні методи у ветеринарній репродуктології : навчальний посібник / В. В. Ковпак та ін. Київ : НУБіП України, 2020. 102 с.
2. Біотехнологія відтворення у тваринництві : навчальний посібник / М. В. Себа та ін. Київ : ТОВ «ЦП «Компринт», 2019. 126 с.
3. Біотехнологія репродукції організмів : конспект лекцій / уклад. В. О. Мельник, С. П. Кот, О. О. Кравченко. Миколаїв : МНАУ, 2017. 104 с.
4. Капрельянц, Л. В. Теоретичні основи біотехнології : навчальний посібник. Харків : Факт, 2020. 291 с.
5. Каратєєва О. І., Юлевич О. І. Загальна біотехнологія : курс лекцій для здобувачів (короткого циклу) рівня вищої освіти ОПП «Біотехнології та біоінженерія» спеціальності 162 «Біотехнології та біоінженерія» денної форми здобуття вищої освіти. Миколаїв : МНАУ, 2022. 107 с.
6. Федоренко С. Я., Науменко С. В. Технологія відтворення тварин : навчальний посібник / Харківська державна зооветеринарна академія, кафедра ветеринарної репродуктології. Харків : РВВ ХДЗВА, 2017. 204 с.
7. Юлевич О. І., Ковтун С. І., Гиль М. І. Біотехнологія : навчальний посібник / за ред. М. І. Гиль. Миколаїв : МДАУ, 2012. 476 с.
8. Яблонський В. А. Біотехнологічні і молекулярно-генетичні основи відтворення тварин. Львів : Афіша, 2009. 217 с.
9. Яблонський В. А. Біотехнологія відтворення тварин. Київ : Арістей, 2005. 293 с.
10. Яблонський В. А. Практичне акушерство, гінекологія та біотехнологія відтворення тварин з основами андрології. Київ : Мета, 2002. 317 с.

Навчальне видання

## **Біотехнологія репродукції організмів**

Курс лекцій

Укладачі: **Лумедзе Імінжон Халідович**

**Посухін Вадим Олександрович**

Формат 60x84 1/16. Ум. друк. арк. 1,0.

Тираж 20 прим. Зам. № \_\_\_\_\_

Надруковано у видавничому відділі  
Миколаївського національного університету  
54020, м. Миколаїв, вул. Георгія Гонгадзе, 9

Свідоцтво суб'єкта видавничої справи ДК № 4490 від 20.02.2013 р.