

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
МИКОЛАЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ АГРАРНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
Факультет технології виробництва і переробки продукції тваринництва,
стандартизації та біотехнології
Кафедра біотехнології та біоінженерії

БІОТЕХНОЛОГІЯ РЕПРОДУКЦІЇ ОРГАНІЗМІВ

Методичні рекомендації до виконання лабораторно-практичних робіт
для здобувачів першого (бакалаврського) рівня вищої освіти ОПП
«Біотехнології та біоінженерія» спеціальності 162 «Біотехнології та
біоінженерія» денної форми здобуття вищої освіти

Миколаїв
2024

УДК 606:636.082

Б63

Друкується за рішенням науково-методичної комісії факультету ТВППТСБ Миколаївського національного аграрного університету від 24 квітня 2024 р., протокол № 9.

Укладачі:

- Гиль М. І. – доктор с.-г. наук, професор, академік НАНВО України, професор кафедри біотехнології та біоінженерії Миколаївського національного аграрного університету;
- Посухін В.О – асистент кафедри біотехнології та біоінженерії Миколаївського національного аграрного університету.

Рецензенти:

- Калиниченко Г. І. – кандидатка с.-г. наук, доцентка, голова науково-методичної комісії факультету кафедри технології виробництва продукції тваринництва Миколаївського національного аграрного університету;
- Кот С. П. – кандидат біол. наук, доцент, доцент кафедри ветеринарної медицини та гігієни Миколаївського національного аграрного університету.

ЗМІСТ

Лабораторна робота № 1 «Вивчення морфофункціональних особливостей статевих органів та феноменів статевого циклу».....	4
Лабораторна робота № 2 «Методи діагностики вагітності».....	10
Лабораторна робота № 3 «Стимуляція суперовуляції у донорів».....	14
Лабораторна робота № 4 «Пошук, оцінка та маніпуляція з ембріоном».....	18
Лабораторна робота № 5 «Зберігання ембріонів».....	27
Лабораторна робота № 6 «Пересадження ембріонів».....	31
Лабораторна робота № 7 «Культивування та запліднення <i>in vitro</i> ».....	34
Лабораторна робота № 8 «Техніка отримання клонів».....	38
Лабораторна робота № 9 «Техніка трансгенезу».....	42
Практична робота № 1 «Одержання клонів тварин».....	46
Практична робота № 2 «Одержання химерних тварин».....	52
Практична робота № 3 «Одержання трансгенних тварин».....	58
Практична робота № 4 «Аномалії розвитку ембріонів та тварин, отриманих методами клітинної та генної інженерії».....	63
Список рекомендованої літератури.....	66

Лабораторна робота № 1 «Вивчення морфофункціональних особливостей статевих органів та феноменів статевого циклу»

План:

1. Препарування статевих органів корів, овець, свиней і кобил.
2. Фолікули і жовте тіло, його оцінка.
3. Діагностика тічки, статевого збудження, охоти і овуляції клінічними та лабораторними методами.

1. Препарування статевих органів корів, овець, свиней і кобил

Оглядаючи та препаруючи свіжі органи забитих тварин, вивчаючи їх будову на живих тваринах шляхом зовнішнього огляду, а також застосовуючи піхвовий та ректальний методи дослідження самок, закріплюють набуті знання з анатомії статевих органів.

Зовнішні статеві органи самок. Статеві органи самок умовно поділяють на зовнішні (статеві губи, переддвер'я піхви та клітор) і внутрішні (піхва, матка, яйцепроводи і яєчники).

Зовнішні статеві органи

Статеві губи (*labia piidendi*) представляють єдине ціле з переддвір'ям піхви. Це добре розвинута складка шкіри, що формує зовнішній статевий отвір – статеву щілину, утворюючи вхід до сечостатевого переддвір'я. Їх сполучення зверху і знизу називаються комісурами. У товщі статевих губ розсіяне багато потових і сальних залоз та залягає м'яз-сфінктер, який замикає статеву щілину. Шкіра статевих губ тонка, зібрана в численні складки.

У корів, буйволиць, свиней, овець, кіз і сук дорзальна комісура статевої щілини заокруглена, а вентральна – загострена. У кобил, навпаки, верхня комісура загострена, а нижня – заокруглена.

Клітор (*clitoris, cunnus*) – гомолог статевого члена самців, знаходиться у нижній комісурі статевої щілини. Він складається з двох ніжок (що прикріплюються до сідничних бугрів), тіла (що закінчується голівкою). У кобил клітор має довжину до 2 см, а у овець і кіз він розвинутий слабо.

Сечостатеве переддвір'я (*vestibulum vaginae*) представляє собою коротку м'язову трубку, що починається краніально біля сечовивідного отвору і закінчується біля статевої щілини. Переддвір'я піхви виконує ті ж функції, що і власне піхва, окрім того через нього виводиться сеча.

Слизова оболонка переддвір'я покрита плоским багат шаровим епітелієм з сосочковим шаром, тобто близька за будовою до шкіряного покриву. В основі слизової оболонки мається кавернозний шар, численні залози і одна пара великих Бартолінієвих залоз. Головна функція цих залоз –

забезпечити зволоження стінки переддвір'я, що дозволяє здійснювати очищення порожнини переддвір'я від механічних частинок і мікробів.

Внутрішні статеві органи

Піхва (*vagina*) представляє собою видозмінену каудальну ділянку Мюллерового каналу і каудально переходить у відносно короткий, зовсім іншого походження, сечостатевий синус або сечостатеве переддвір'я (присінок). Піхва є органом спаровування і вивідним каналом статевої системи, має вигляд перетинчастого каналу, що добре розтягується. Вона розміщена у тазовій порожнині. Довжина її сягає у корів 30, кобил – 35, овець і кіз – 12-15, свиней – 18, сук – 10 сантиметрів.

Матка (*metra, uterus*) розвивається з середнього відділу Мюллерових каналців. Вона представляє собою м'язовий порожнинний орган, що служить місцем розміщення плоду і забезпечує його розвиток у ссавців. Повного свого розвитку матка досягає у статевозрілих тварин. У різних видів тварин матка за розмірами і формою не однакова. У жуйних тварин і свиней матка дворога, у кролиць – роздільнорога, а у кобил роги відсутні.

Тіло (*corpus uteri*) дворогої матки має незначні розміри, наприклад, у корів довжиною 2-6 см, у овець і кіз – 2-4 см. У жуйних матка представлена рогами матки, несправжнім тілом та тілом матки і шийкою матки. Тіло матки переходить у роги, що дуже покручені і звужуються краніально. Довжина рог становить у овець 8-20 см, у корів – 25-50 см, а у свиней – навіть до 2 метрів.

Роги матки (*cornu uteri*) жуйних на значному відрізку зовні злиті між собою і утворюють так зване «несправжнє» тіло матки. Роги матки загинаються таким чином, що від несправжнього тіла спрямовуються вперед і донизу, потім назад і доверху і знову дещо вперед, весь час злегка відхиляючись латерально. Біля несправжнього тіла вільні роги зв'язуються між собою мостиками серозної оболонки, що називаються міжроговими зв'язками.

Стінка матки складається з трьох шарів: слизової оболонки (*endometrium*), м'язової оболонки (*miometrium*) та серозної оболонки (*perimetrium*).

Шийка матки (*cervix uteri*). Її форма у різних видів тварин є різною. У однокопитних, великої рогатої худоби, оленів, хижаків вона різко виступає до порожнини піхви, утворюючи вагінальну частину шийки (*orificium externum*). У інших видів тварин, наприклад, свиней, вагінальна частина шийки відсутня, а на місці переходу піхви у матку є лише поперечні складки слизової оболонки. У овець кіз вона виражена не чітко.

Яйцепроводи (*tuba uterina, s. oviductus*) – теж парні внутрішні статеві органи самок, і являють собою видозмінені краніальні відділи Мюллерових

каналців плоду. Вони представляють собою тонкі, дуже покручені трубки, що сполучають яєчники з рогами матки. Розрізняють лійку, ампулу, тіло і істмус яйцепроводу. Закладені яйцепроводи у товщі широкої маточної зв'язки і нею утримуються.

Довжина яйцепроводу в овець становить 9-18 см, у корів – 25- 30 см, у кобил – 14-30 см, у свиней – 12-23 см.

Фізіологічна функція яйцепроводів – проведення сперміїв до місця запліднення яйцеклітини і транспорт заплідненої яйцеклітини до матки.

Яєчники (*ovaria*) – парний орган представлений паренхимною і стромою, у більшості тварин овальної, мигдалеподібної, у птахів гронавидної форми, у свиней – за формою нагадують ягоду шовковиці. Це головні статеві залози, що продукують яйцеклітини (головний статевий продукт самок). Окрім того, в них виробляються статеві гормони (естрогени – естрон, естрол, естрадіол, фолікулін, прогестерон).

На розтині яєчника розрізняють білкову (серозну) оболонку, фолікулярну зону (корковий шар) та центральну (мозкова, судинна) зону.

Максимальних розмірів яєчники досягають у дорослих тварин, які вже мали роди. У кобил, великої рогатої худоби, овець яєчники мають еліпсоїдну форму; їх маса у великої рогатої худоби становить у середньому 14-20 г, довжина – 3,5-5,0 см, ширина – 2,0-2,8 см, товщина – 1,5-2,0 см. У кобил маса яєчників становить у середньому 20-30 г. У свиней яєчники за формою нагадують ягоду шовковиці, що зумовлено наявністю великої кількості фолікулів і жовтих тіл. З цієї причини їх розміри і маса дуже варіюють. У статевозрілих свиней яєчники мають довжину 2,0-8,5 см, ширину – 1,5-2,0 см, товщину – 0,9-1,8 см, масу – 5-9 г. В овець яєчники мають плоскоовальну форму; їх маса коливається від 0,6 до 3 г, довжина – від 0,5 до 1,0 см, ширина – від 0,3 до 0,5 см, а перед овуляцією збільшується до 2,0-2,2 см. Зовні на яєчнику виділяють велику та малу кривизну. В ділянці малої кривизни знаходяться ворота яєчника, через які до них проникають судини та нервові волокна.

2. Фолікули і жовте тіло, його оцінка

У фолікулярній зоні яєчника міститься велика кількість зародкових клітин, з яких розвиваються фолікули (*foliculi ovariei*). Тут зустрічаються фолікули на різних стадіях зрілості, тому вони мають різні розміри.

Наймолодші фолікули складаються лише з однієї зародкової (яйцевої) клітини та епітеліальної оболонки, що її оточує. З ростом і дозріванням фолікулів формується порожнина, заповнена фолікулярною рідиною (Граафові пухирці). Зрілий фолікул складається з двох оболонок: зовнішньої –

сполучнотканинної і внутрішньої (зернистий шар) – утвореної полігональними клітинами, які здійснюють ендокринну функцію. З середини оболонка фолікула представлена 5-7 рядами фолікулярних клітин, що утворюють, так званий «зернистий шар». На одній ділянці цей шар потовщується. Це потовщення називають яйценосим пагорбом. У ньому знаходиться яйцеклітина – ооцит першого порядку.

Фолікули повної стиглості містять готову до запліднення яйцеклітину, мають значні розміри, вип'ячуються міхурцями на поверхні яєчника. У кобил вони досягають діаметру 3-8 см і не виділяються на поверхні великої кривизни яєчника, а знаходяться в області малої кривизни, яку називають овуляційною ямкою (це значно полегшує ректальне дослідження з метою визначення оптимальних термінів осіменіння кобил). У корів розміри фолікулів становлять 0,8-2,0 см (при ректальному дослідженні бугристість поверхні яєчника свідчить про високу його функціональну активність); у овець – до 1,0 см; у свиней – 0,8-1,5 см. У цих тварин вони добре виділяються на всій поверхні яєчника.

Фолікули, в яких наступила стадія дозрівання, виступають на поверхні яєчника, їх стінка під внутрішнім тиском фолікулярної рідини потоншується і розтягується. Одночасно потоншується і розтягується серозна оболонка яєчника. Завершується це тим, що стінка фолікула і поверхневий шар яєчника розриваються і яйцеклітина з фолікулярною рідиною викидаються до лійки яйцепроводу. Це складне біологічне явище називається овуляцією, яку можна розглядати як здійснення залозою зовнішньої секреції через порушення цілісності стінки самого органу, адже своєрідність яєчника, як залози зовнішньої секреції, полягає в тому, що у ньому відсутні спеціальні вивідні протоки, а яйцеклітини виділяються періодично шляхом розриву стінки яєчника.

На місці фолікула, що лопнув, розвивається жовте тіло – тимчасова залоза внутрішньої секреції. Коли здійснюється запліднення, то воно функціонує протягом всього періоду вагітності і називається жовтим тілом вагітності. При умові, що запліднення не відбулося, воно розсмоктується і називається циклічним жовтим тілом, перетворюючись у біле тіло. Фолікули, які не овулювали, теж розсмоктуються і перетворюються в атретичні тіла, що виділяються пігментованими плямами на поверхні яєчника.

Жовте тіло, яке досягло повної стиглості, починає продукувати гормони лютеостерон, корпорін, прогестерон, що підтримують проліферативні процеси у матці (розростання тканини шляхом новоутворення клітин), стимулюють їх гіперемію і гіперплазію протягом періоду вагітності.

Якщо слідом за овуляцією не настає запліднення і вагітність, то жовте тіло швидко розсмоктується і називається таке жовте тіло «циклічним жовтим тілом», а якщо вагітність настає, то жовте тіло розростається, може займати більшу частину паренхіми яєчника і називається «жовтим тілом вагітності». Таке жовте тіло функціонує протягом всього періоду вагітності і лише наприкінці її, або зразу після родів розсмоктується. Такі жовті тіла відносять до фізіологічно нормальних. Але, зустрічаються випадки, коли після акту родів жовте тіло вагітності не розсмоктується. Таке жовте тіло називається персистентним. Це приклад патологічного жовтого тіла. За таких умов тварина не проявляє статевої охоти після родів.

Овуляція у самок регулюється секрецією гіпоталамусом гонадотропного рилізінг-гормону (гонадоліберін), який стимулює секрецію передньою долею гіпофіза лютеонізуючого гормону (ЛГ).

Овуляція у більшості сільськогосподарських тварин здійснюється спонтанно, тобто вона не пов'язана ані зі статевим актом, ані з дією якогось іншого зовнішнього фактору. А, наприклад, у кролиць вона здійснюється тільки за наявності коїтусу (спаровування), що певною мірою ускладнює проведення штучного осіменіння цього виду тварин.

Овуляція здійснюється у корів через 10-15 годин після згасання охоти, у свиней – починаючи з другого дня охоти, у овець – через 25-27 годин після початку охоти, у кобил – з третього і навіть до 7-12-го дня охоти.

3. Діагностика тічки, статевого збудження, охоти і овуляції клінічними та лабораторними методами

Післяродовий період у скотарстві триває більше 30 днів, і статеву охоту у корів слід виявляти починаючи з 14 дня після отелення. 100% корів у стані статевої охоти можна виявити тільки за умови чотириразового спостереження, тривалістю по 30 хвилин, протягом дня, за умов триразового – до 90%, дворазового – до 80%, одноразового – лише до 60% тварин в охоті.

Виявляють корів і телиць в охоті різними способами – візуально оглядаючи зовнішні статеві органи і за проявом рефлексу «нерухомості», з використанням бугаїв-пробників, а також з використанням інструментальних методів тощо. Найкраще, коли всі ці методи поєднуються і використовуються комбіновано.

Тривалість статевого циклу у корів становить 19-21 добу, а статевої охоти – до 36 годин. Овуляція найчастіше здійснюється через 10-14 годин після згасання охоти.

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.

Зовнішньо тічка проявляється набряканням та почервонінням статевих губ, волоски біля нижнього кута статевої щілини бувають вологими. На нижній поверхні кореня хвоста, на сідничних 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.

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

Ознаки загального збудження – корова стає рухливішою, неспокійною, реве, часто переступає з ноги на ногу, в неї погіршується апетит, знижується надій. Через деякий час у неї з'являється обіймальний рефлекс на самку – вона дозволяє стрибати на неї іншим самкам, але ще не завжди допускає садку бугая. Іноді статевого збудження у корів не буває.

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.

Характерною ознакою статевої охоти є позитивна реакція самки на самця. Вона сама розшукує самця, стає в позу для статевого акту і допускає робити на себе садку як самця, так і самки. На корову в охоті можуть стрибати не лише корови не в охоті, а й вагітні, тому осіменяти слід ту корову, яка допускає робити на ній садку і в якій виражені ознаки тічки.

Овуляція – вихід яйцеклітини з фолікула.

Контрольні питання:

1. Охарактеризуйте загальну схему будови статевої системи самок сільськогосподарських тварин.
2. Охарактеризуйте функцію яєчників як залози внутрішньої і зовнішньої секреції.
3. Охарактеризуйте статевий цикл, вкажіть його стадії.
4. Назвіть основні ознаки статевої охоти самок сільськогосподарських тварин.
5. Що таке тічка, її фази?
6. Охарактеризуйте загальне статеве збудження.

Лабораторна робота № 2 «Методи діагностики вагітності»

План:

1. Клінічні методи діагностики вагітності.
2. Зовнішні методи.
3. Внутрішні методи діагностики вагітності і неплідності.
4. Рефлексологічний метод діагностики.
5. Лабораторні методи.

1. Клінічні методи діагностики вагітності

Клінічні методи діагностики вагітності включають:

1. Збір анамнезу.
2. Рефлексологічний метод (застосування самця-пробника).
3. Зовнішнє дослідження: огляд; пальпація; аускультация.
4. Внутрішнє (акушерське) дослідження: вагінальне; ректальне.
5. Фізичні методи: ультразвукове дослідження (УЗД); лапароскопія (з використанням ендоскопу); амніоскопія; рентгеноскопія і рентгенографія; електропунктурна рефлексотерапія.

2. Зовнішні методи

Зовнішнє дослідження на вагітність методом пальпації ґрунтується на виявленні плода через черевні стінки матері. Цей метод застосовується для визначення вагітності у другій її половині. Хоча це не завжди вдається, бо велике напруження черевних м'язів і обширність черевної порожнини часом не дають можливості обмацати плід, тому його доцільніше застосовувати з 7-го місяця жеребності, а у корів не раніше 6-го місяця, у овець і кіз – з 3-го місяця, у свиней – тільки в кінці поросності, у сук – не раніше 4–5-го тижня, у кролиць – з 12-го дня.

Зовнішнє дослідження, як вказано вище, включає огляд, пальпацію і аускультацию. Оглядом установлюють зміни об'єму черевної стінки та її асиметрію, рухи плода, виповнення молочної залози у нелактуючих самок, набряк молочної залози.

У зв'язку з розвитком вагітності об'єм живота у самки поступово збільшується. Це особливо помітно в другій половині вагітності, коли живіт стає асиметричним. У корів, овець і кіз звичайно обвисає і випинається права черевна стінка, кобил – ліва. У молодих маток це збільшення малопомітне, у старих тварин з обвислим животом такі ознаки виявляють і за відсутності вагітності. У свиней, сук і кішок нерідко буває чітко помітне рівномірне збільшення середини і опускання нижньої стінки живота, проте коли у них розвивається в матці мало плодів, форма живота не змінюється. У сук

карликових порід при розвитку великої кількості плодів форма живота буває кулястою і трохи випинаються ребра, а у хортиць при вагітності часто не виявляють змін контурів живота.

Нарикінці вагітності у тварини западають крижі, трохи набрякають статеві губи, кінцівки і навіть черево. У овець, кіз, свиней, особливо у корів за кілька днів до родів починає витікати слиз із статевої щілини.

В останньому періоді вагітності у дійних корів і кіз молоко часто на смак стає гіркувато-солоним. Виділення молока припиняється за 2 і більше місяців до родів. У високопродуктивних тварин молоко перестає виділятися значно пізніше. Вим'я починає набухати у корів, кіз і овець, що раніше родили, тижнів за 2–4, а у вагітних вперше – за півтора – два місяці до настання родів. У всіх видів тварин звичайно за кілька днів до родів з'являється у молочній залозі молозиво, якого можна видіти кілька краплин. Треба не забувати, що у сук опухання молочних залоз і видоювання молока є далеко не певною ознакою щінності, бо це спостерігається і у нещінних сук.

3. Внутрішні методи діагностики вагітності і неплідності

Внутрішнє дослідження на вагітність проводять піхвовим та ректальним методами.

Дослідженням через піхву користуються дуже рідко і тільки в сумнівних випадках вагітності. Для цього треба спочатку старанно підготувати ту руку, яку не вводили напередодні в пряму кишку (вимити в гарячій воді з милом і обробити дезінфікуючим розчином). Вводячи руку в піхву, помічають уже з 30–40-го дня вагітності, що слизова оболонка піхви відзначається сухістю, а зовнішній отвір шийки матки щільно закритий слизом.

З подальшим розвитком вагітності сухість зростає, шийка матки змінює своє положення, бо матка опускається в черевну порожнину, довжина піхвової трубки збільшується.

Щоб наочно переконатися у цих змінах піхви та шийки матки, можна застосувати їх огляд через піхвове дзеркало. Для цього дзеркало повинно бути чистим і стерильним.

При цьому виявляють такі ознаки вагітності: слизова оболонка піхви та піхвового виступу шийки матки має деяку анемічність і вкрита клейким слизом. Канал шийки матки – закритий клейким слизовим корком.

За невагітного стану слизова оболонка буває блискуча, рівномірно рожева; канал шийки матки у кобил і у корів поза періодом тічки буває закритим і радіальні складки слизової оболонки рельєфно виступають.

При мануальній пальпації через стінку склепіння піхви у великих тварин незадовго до родів промацуються передлежачі частини плода.

Треба зазначити, що вказані ознаки не можна вважати сталими і абсолютно точними. Вони є тільки орієнтовними при визначенні вагітності у тварин.

4. Рефлексологічний метод діагностики

Рефлексологічний метод (проба самцем-пробником) – дозований контакт самців і самиць (по 1,5–2,0 год. вранці і ввечері) використовується в основному для виявлення статевої охоти у осіменених самиць. Якщо у самки наступила вагітність, то у неї не проявляється стадія збудження статевого циклу при дозованому щоденному контакті з пробником. Цей метод у різних видів тварин може мати різну цінність: у корів, кобил, свиней, овець, кіз його точність може досягати 95%, а у кролів, через ймовірний допуск коїтусу сукрільними самками, точність методу дуже низька. Проте відсутність статевої циклічності і охоти у самок не є об'єктивним показником вагітності.

Слід пам'ятати, що пробники, яких використовують для рефлексологічної діагностики вагітності, повинні утримуватися окремо від самок і необхідно годувати їх як плідників. Сумісне перебування пробників з самками понад 1,5–2,0 години призводить до зниження активності прояву статевих рефлексів. Самок з виявленою статевою охотою зразу ж видаляють від пробника, що збільшує ефективність його використання.

Спеціально підготованих бугаїв-пробників (одного на 150-200 корів) щоденно вранці та ввечері випускають на 1,5-2,0 години в загони, де знаходяться корови. Такий дозований контакт бугаїв з коровами сприяє прояву у них стадії збудження статевого циклу. Якщо у корови протягом 30 днів після осіменіння, при щоденному контакті з бугаєм, не проявилася стадія збудження статевого циклу, то її вважають умовно тільною.

5. Лабораторні методи діагностики вагітності

Різними авторами запропоновано багато лабораторних методів діагностики вагітності, серед яких є загальновідомі, в буквальному сенсі народні, такі як крапельна і спиртова проби з молоком, кип'ятіння цервікального слизу і т.п., але вони не об'єктивні. Заслуговують на увагу такі лабораторні методи.

1. Гормональні: – визначення прогестерону (кобили, корови, свині, вівці, кози) проводять радіоімунологічним або імуноферментним методом – визначення естрогенів у плазмі крові кобил і корів

радіоімунологічним методом або за тестами еластичності і кристалізації тічкового слизу є пізнішими методами діагностики – визначення релаксину (суки та інші самки).

2. Біологічні: – тести для визначення КХГ у кобил (найбільш поширені – це реакція Ашгейма-Цондека, тест Фрідмана, тест Гайї-Меніні або сперматозоїдна реакція).
3. Імунологічні: – тест на визначення КХГ; тест на визначення концентрації фібриногену і протеїнів гострої фази (реакція на нідацію), які виявляються в крові сук, починаючи з 20-го дня вагітності.
4. Імунохімічні: – тест на визначення КХГ. Він проводиться шляхом імуноелектрофорезу у желатиновому гелі.
5. Хімічні: – реакція Кюбоні на визначення естрогенів у сечі кобил була запропонована у 1937 р. В її основу покладено принцип реакції флуоресценції, що викликається естрогенами у присутності сірчаної кислоти.
6. Гістологічні: – вагінальна біопсія у свиней та овець базується на зменшенні кількості шарів епітелію слизової оболонки піхви до 2-3 у період вагітності і збільшенні його до 15-20 у тварин, які не запліднилися. Метод дає 95% об'єктивних результатів (у свиней з 20-го дня супоросності, а в овець з 40-го дня суягності). Загальними недоліками лабораторних методів діагностики вагітності є їх кропіткість, мала продуктивність і неможливість визначення строку вагітності.

Контрольні питання:

1. Перелічіть клінічні методи діагностики вагітності.
2. Що включає зовнішнє дослідження тварин?
3. Якими методами проводять зовнішнє дослідження тварин?
4. Як змінюється об'єм живота вагітної самки?
5. Суть рефлексологічного методу діагностики.
6. Опишіть лабораторні методи діагностики вагітності.

Лабораторна робота № 3 «Стимуляція суперовуляції у донорів»

План:

1. Складання гормонограми.
2. Визначення рівня суперовуляції у донорів.
3. Обладнання, середовище та їх підготовка до вимивання ембріонів.
4. Вимивання ембріонів різними способами.

1. Складання гормонограми

Для проведення планомірної підготовки до трансплантації груп донорів і реципієнтів складається гормонограма, що дозволяє контролювати хід робіт протягом всього періоду роботи з тваринами. Приведена гормонограма розроблена при застосуванні фолітропіну, аналогічно складається гормонограма для всіх препаратів при трансплантації ембріонів.

ГОРМОНОГРАМА підготовки корів-донорів і телиць-реципієнтів

Господарство _____ району _____ області _____
_____ (при використанні фолітропіну) 20__ рік

№ п/п	Назва заходів	Група донорів				
		Приклад	I	II	III	IV
1	2	3	4	5	6	7
1.	Відбір корів після отелу до осіменіння	10.01				
2.	Перше гінекологічне обстеження (наявність жовтих тіл яєчників)	22.01				
3.	Друге гінекологічне обстеження (контроль наявності жовтих тіл яєчників)	12.02				
4.	Перше визначення прогестерону	12.02				
5.	Друге визначення прогестерону	19.02				
6.	Інв. номер корів-донорів					
7.	Перше введення естрофану (за наявності жовтих тіл яєчників) введення вітамінів А, Д, Є	25.02				
8.	Друге введення естрофану (за наявності жовтих тіл яєчників) введення вітамінів А, Д, Є	07.03				
9.	Виявлення статевої охоти	10.03				
10.	Визначення прогестерону	10.03				
11.	Контроль жовтого тіла яєчників і введення вітамінів А, Д, Є	19.03				
12.	Введення фолітропіну-I (8 – 20 год.)	20.03				
13.	Введення фолітропіну-II (8 – 20 год.)	21.03				

1	2	3	4	5	6	7
14.	Введення фолітропіну-III (8 – 20 год.)	22.03				
15.	Введення фолітропіну-IV (8 – 20 год.) Введення естрофану (8 – 20 год.)	23.03 23.03				
16.	Осіменіння (8 – 19 год.)	25.03				
17.	Повторне осіменіння через 12 год.	26.03				
18.	Вимивання ембріонів	01.04				
1.	Відбір реципієнтів	29.01				
2.	Гінекологічне обстеження	05.03				
3.	Інв. номер реципієнтів					
4.	Перше введення естрофану (8 год.) введення вітамінів А, Д, Є	11.03				
5.	Друге введення естрофану – 16 год. (при наявності жовтих тіл яєчників) введення вітамінів А, Д, Є	22.03				
6.	Виявлення статевої охоти	25.03				
7.	Контроль жовтого тіла	01.04				
8.	Пересадка ембріонів 01.04					

2. Визначення рівня суперовуляції у донорів

Визначення рівня суперовуляції проводиться за допомогою пальпації, та діагностичних методів сучасної техніки.

3. Обладнання, середовище та їх підготовка до вимивання ембріонів

Для вимивання ембріонів у корів-донорів розроблено багато катетерів, що відрізняються між собою за матеріалом виготовлення та конструктивна. У практиці, в основному, користуються модифікаціями двоканального катетера Фоллея, виготовлених із нетоксичної для ембріонів гуми, латексу, поліетилену, силікону. Цей катетер має один канал, на початку якого кріпиться насадка для фіксації стилету, а на другому кінці він запаяний і має декілька отворів збоку. Через цей канал у матку подається і виводиться з неї середовище для вимивання ембріонів. Другий канал слугує для подачі в балончик повітря, який розміщений недалеко від останнього бокового отвору на протилежному кінці катетера. Завдяки балончику, наповненому повітрям, катетер фіксують у розі матки та одночасно перекривають його і не дозволяють виходити середовищу для вимивання в тіло матки. Ці катетери випускаються різних розмірів від 12 до 20 номера і розраховані на широкий

спектр застосування у телиць і корів. Найчастіше використовують катетери 16 і 18 номерів.

У триканальному катетері фірми — IMV, як і інших фірм, третій канал слугує для виведення з матки середовища. Такі катетери в практиці не знайшли широкого впровадження.

Катетери німецької фірми «Minitub» випускають у двох модифікаціях: з металевим наконечником і без нього. Металевий наконечник забезпечує промивання обох рогів матки одним катетером, але потребує дуже обережного поводження через можливість травмування ендометрію.

При використанні двоходового катетера «Minitub» та модифікованих катетерів вітчизняного виробництва, на всю довжину його вставляють металевий стилет, який фіксують у насадці.

Перед з'єднанням катетера із стилетом необхідно промити катетер, заливши в середину 20 мл середовища для вимивання. Стиллет промиваємо такою ж кількістю середовища з верхнього кінця до фіксатора. Стиллет з'єднуємо з катетером на витягнутих руках, щоб його кінець ненароком не торкнувся халата. Поверхню підготовленого катетера зволожують із верхівки до фіксатора препаратом «Керолан», або водорозчинним желе «К-У», чи середовищем для вимивання ембріонів. Потім вставляють катетер у санітарний чохлик.

Приготування середовища для вимивання ембріонів: до фосфатно-буферного середовища Дюльбекко (ФБС) додаємо фетальну сироватку (2% – 20 мл на 1 л ФБС) або БСА (0,4% – 4 г бичачого сироваткового альбуміну на 1 л ФБС) та препарат для санірування (комплекс антибіотиків – 12 мкг/см³ гентаміцину + 100 од/см³ ампіцеліну).

У разі використання в якості посудини для збору ембріонів вимивних фільтрів їх вимивають середовищем без сироватки і БСА для запобігання утворення піни в розчині, яка утруднює їх пошук. У такому випадку необхідно прискорити пошук ембріонів із метою швидкого перенесення їх у середовище для культивування.

4. Вимивання ембріонів різними способами

Із катетера, який зафіксований в розі матки, витягують стилет і починають вимивати ембріони. Ембріони вимивають трьома способами, що відрізняються між собою технічно та об'ємом середовища, яким його проводять. Техніка подачі середовища в ріг матки є для всіх способів однаковою.

Перший спосіб полягає в асептичному вимиванні ембріонів самопливом (гравітаційний). Для цього через трійник до катетера приєднують ще два

шланги, які мають фіксатори для перекриття каналу. Один слугує для подачі середовища в матку. Для цього в пляшку з середовищем через пробку вставляють дві стерильні голки. Одну коротку з великим діаметром (зазвичай голку для взяття крові), а другу довгу до упору в дно пляшки для подачі повітря. До короткої голки приєднують шланг із закритим фіксатором, перевертають пляшку догори та розміщують у фіксаторі на відстані 1 м над крупом тварини. Кінець другого шлангу, з закритим фіксатором, закріплюють отвір в кришці в стерильній пляшці або в фільтрі. За таким способом для промивання одного рогу матки 400-500 см³ середовища для вимивання ембріонів.

Другий спосіб полягає в примусовій подачі та відборі середовища із матки шприцами об'ємом 50-60 см³. для промивання одного рогу використовують 250-300 см³ середовища.

Третій спосіб – комбінований. Шприцами об'ємом 50-60 см³ подають середовище в ріг матки, а забирають самопливом в стерильну теплу пляшку. Після подачі середовища в матку, пережимають пальцями катетер біля фіксатора стилета, від'єднують від нього шприц і вставляють його кінець в горловину пляшки. Середовище із рога матки самопливом витікає в пляшку. Слід пам'ятати, що воно повинно витікати по стінці пляшки, щоб у ембріоні не порушилися зв'язки між ембріобластами, що може трапитися під час його удару об поверхню середовища при не дотриманні цього правила. Для промивання одного рогу матки використовують 400-500 мл середовища. Останніх два способи при дотриманні правил асептики дозволяють вимивати ембріони в донорів прямо в стійлах, що важливо при проведенні контрольної стимуляції суперовуляції.

Контрольні питання:

1. Для чого складається гормонограма?
2. Яким чином визначається рівень суперовуляції у донорів?
3. Охарактеризуйте різні форми катетерів.
4. Назвіть основні складові середовища для вимивання ембріонів.
5. Охарактеризуйте вимивання ембріонів різними способами.

Лабораторна робота № 4 «Пошук, оцінка та маніпуляція з ембріоном»

План:

1. Підготовка обладнання та середовищ.
2. Седиментація, пошук ембріонів.
3. Оцінка ембріонів.
4. Реєстрація даних про ембріони в журналі.
5. Мікрохірургічне ділення ембріонів.

1. Підготовка обладнання та середовищ

Вся робота по пошуку і оцінці ембріонів повинна проводитись в спеціальному стерильному боксі при температурі 25-26°C. В боксі проводять вологе прибирання, а за 1-2 години до роботи з ембріонами протирають 70% спиртом робочі поверхні приладів і включають бактерицидну лампу. Персонал повинний працювати в халатах, шапочках або косинках, користуватись стерильним посудом і інструментом. Руки перед роботою обробляють тампоном, зволженим 70% спиртом. По французькій технології передбачена вся робота з ембріонами під ламінарним потоком відфільтрованого повітря в спеціальних шафах.

2. Седиментація, пошук ембріонів

При пошуку і оцінці ембріонів працюють в наступній послідовності. Після вимивання ембріонів з статевих шляхів корів-донорів ємкості з промивною рідиною переносять в термостат при температурі 37°C, де відбувається відстоювання та осадження ембріонів. Після відстоювання верхню частину промивної рідини відсмоктують за допомогою сифону або шприця з довгою голкою, залишаючи 50-100 мл рідини. Залишок промивної рідини розливають в 2-3 чашки Петрі (з пластику), дно котрих для зручності пошуку розчерчено на квадрати 1×1 см. Під бінокулярною лупою або стереоскопічним мікроскопом при 14–28-кратному збільшенні знаходять ембріони і за допомогою шприця з скляною прозорою голкою їх переносять в малі чашки Петрі в поживне середовище для короткотермінового зберігання і оцінювання. Можливо переносити знайдені ембріони в годинникові скельця в 1 мл поживного середовища, в лунки пластикових планшетів для серологічних досліджень.

Але процес пошуку ембріонів необхідно прискорювати, тому за Харківською технологією пропонується промивну рідину одразу збирати в одноразові конусоподібні поліетиленові ємкості, які підвішують на штатив на

20 хвилин для осідання (седиментації) ембріонів. По закінченню осідання нижню частину ембріоприймача перепаюють термозажимом і ножицями відрізають від приймальної ємкості.

За англійською технологією промивна рідина під час вимивання одразу проходить через ємкість з ситечком, діаметр отворів якого 90-100 мкм, тому ембріони лишаються в ємкості, їх розмір коливається від 130 до 150 мкм. Тому відпадає потреба відстоювати промивну рідину протягом 20 хвилин, а зразу починається пошук.

Якщо в промивній рідині багато слизу, то необхідно брати менше рідини, розбавляючи її поживним середовищем, а для пошуку ембріонів в слизу використовувати гістологічну голку.

3. Оцінка ембріонів

Оцінку якості ембріонів виконують на інвертованому мікроскопі при 100-150-кратному збільшенні. При цьому виявляють незапліднені яйцеклітини, ембріони без ознак розвитку, з дегенерованими змінами оболонки або цитоплазми. Головні методи визначення повноцінності і життєздатності ембріонів наступні:

- візуально-морфологічна оцінка якості ембріонів;
- прижиттєва оцінка ембріонів з використанням флуоресцентних барвників;
- оцінка життєздатності ембріонів методом культивування;
- цитологічна та цитогенетична оцінка ембріонів та інші.

При морфологічній оцінці ембріонів звертають увагу на відповідність між віком ембріону і стадією його розвитку, форму прозорої оболонки та її цілісність, рівномірність дроблення бластомерів та їх компактність, стан цитоплазми, прозорість перевітелінового простору. Біологічно повноцінні ембріони повинні мати чітку кулясту форму, світлу однорідну цитоплазму, непошкоджену прозору оболонку і однакового розміру бластомери з щільним міжклітинним комплексом (полігональні зв'язки).

Неповноцінними вважаються ембріони, які мають різного розміру бластомери з нечіткими клітинними мембранами та іншими ознаками дегенерації.

На 4-7 день свого розвитку ембріон досягає стадії морули, 7-8 день ранньої бластоцисти, на 8-9 – бластоцисти, 9-10 день – пізньої бластоцисти, 10-11 день – ембріон виходить з прозорої оболонки – вийшовши або еспандьований ембріон.

Суперовуляція зумовлює неодночасне запліднення яйцеклітин, тому в промивній рідині можна спостерігати ембріони різного віку, про що свідчать дані таблиці 1.

Таблиця 1

Співвідношення віку ембріонів при вимиванні (%)

День вимивання	Стан вимитих ембріонів					
	Морули (Мо I)	Морули (Мо II)	Ранні бластоцисти (Бл I)	Бластоцисти (Бл)	Пізні бластоцисти (Бл II)	Еспандований ембріон
6 – й	25	67	8	-	-	-
7 – й	17	20	30	23	9	1
8 – й	4	10	21	24	36	5
9 - й	-	-	7	22	43	28

У промивній рідині можуть спостерігатись незапліднені яйцеклітини в стані дегенерації, зі зморщеною, нерівною формою цитоплазми, а також ембріони неправильної форми з порушеною цілістю оболонки, її розривами, розшаруванням, нерівномірним дробленням, порушеннями зв'язку між бластомерами та грануляцією цитоплазми.

Відстаючі від нормального розвитку ембріони з ознаками асинхронності дроблення бластомерів, їх дегенерації – непридатні для трансплантації. Ембріони з невеликими морфологічними змінами вважаються умовно придатними. Але не завжди вдається точно визначити повноцінність 7-8 денних ембріонів, внаслідок їх багатоклітинності.

Дегенерація ембріонів починається ще на стадії морули, під час просування їх по яйцепроводу, але морфологічно це проявляється на більш пізніх стадіях, коли вони опиняються в розі матки.

Тому дуже важливо вірно оцінити вимиті ембріони (табл. 2) і є декілька систем оцінки їх. Так, Елсден (1978) поділяє ембріони на 4 класи – погані, середні, хороші, відмінні;

- Греве (1980) пропонував оцінювати ембріони на: життєздатні, уповільнені (ретардовані), уродливі (дегенеровані) і не запліднені яйцеклітини;
- Райт (1981) класифікує ембріони на 3 класи – нормальні, ембріони з незначними відхиленнями і ембріони з збільшеною кількістю дегенерованих клітин;
- Сергєєв (1982) пропонує 5-бальну систему оцінки ембріонів за морфологічними ознаками.

Але на основі морфологічної оцінки не можна зробити остаточне заключення про їх життєздатність. Все залежить від їх розвитку в процесі культивування і приживлення в розі матки.

Таблиця 2

Показники розвитку ембріонів

Стадія розвитку	Кількість бластомерів	Діаметр, мк	Форма	Стан структур	Перевітєліновий простір
Яйце-клітина	-	120-150	приплюснута	Однорідна клітинна маса	немає
Морула	8-16	130-150	сферична	Бластомери не зрощені, легко можна порахувати	є
Пізня морула	більше 16	130-150	сферична	Бластомери зростаються в компактну масу, не можна підрахувати	є
Рання бластоциста	80-120	130-150	сферична	Не видно границь між бластомерами, ембріон трохи стислий, відокремлюється трофобласт, ембріобласт і невелика порожнина	малий
Бластоциста	300-480	140-200	сферична	Чітко виділяється ембріональний диск і трофобласт, порожнина бластоцисти розширена	малий
Пізня бластоциста	1200-1500	200-400	сферична	Прозора оболонка тонка, розтягнута порожнина бластоцисти і займає всю прозору оболонку	немає
Еспандьований ембріон	більше 1500	200-800	сфера або злегка видовжена	Ембріон не має прозорої оболонки, оточений одним шаром клітин трофобласту	немає

Таблиця 3

Шкала оцінки якості ембріонів

Стадія розвитку	Морфологічна характеристика	Оцінка	Бал	Позначення
Морула рання MoI пізня MoII	*округла форма, ціла прозора оболонка, перевітєліновий простір прозорий, бластомери чіткі, однакового розміру з наявністю полігональних зв'язків, зерниста цитоплазма рівномірна заповнює оболонку	Відмінні	5	++
	*наявність в перевітєліновому просторі гранул і включень, бластомери не однакового розміру, розташовані асиметрично, стиснуті	Добрі	4	+
	*в перевітєліновому просторі гранули і включення, незначне стиснення бластомерів, одиничні зруйновані клітини	Задовільні	3	+
	*деформація прозорої оболонки, часткове руйнування бластомерів, їх стиснення, втрата зв'язку між ними, фрагментація цитоплазми.	Умовно придатні	2	+

	*невідповідність стадії розвитку віку ембріону, дефекти прозорої оболонки, розпад бластомерів, сильне їх стиснення	Непридатні	1	
Бластоциста рання БлІ пізня БлІІ	*куляста форма, прозора оболонка має однакову товщину на всьому відстані, перевітеліновий простір вузький, прозорий, чітка диференціація клітин трофобласту і ембріобласту, добре розпізнається бластоціль	Відмінні	5	++
	*зона пелюциду потоншена, полость бластоцисти велика, займає весь перевітеліновий простір, має гладку поверхню, чітку диференціацію клітин, бластоціль не виражена в перевітеліновому просторі гранули, включення, клітини трофобласту стиснуті мало	Добрі	4	+
	*перевітеліновий простір збільшений, включення, гранули, бластополость не чітка, немає диференціації між клітинами трофобласту і ембріобласту	Задовільні	3	+
	*дефекти прозорої оболонки, наявність гранул, клітинних часток в перевітеліновому просторі, часткове руйнування клітин, стиснення бластомерів	Умовно придатні	2	
	*значні дефекти прозорої оболонки, розпад бластомерів, рихле їх з'єднання	Непридатні	1	+

4. Реєстрація даних про ембріони в журналі

Впровадження методу трансплантації ембріонів у виробництво потребує добре налагодженого первинного зоотехнічного та ветеринарного обліку на всіх етапах технологічного процесу. Чіткий облік на першому етапі трансплантації – підготовці донорів та реципієнтів необхідний для аналізу результатів застосування різних схем, режимів і методів обробки тварин, а також одержання, зберігання і пересадки ембріонів.

На кожну тварину донора і реципієнта заповнюється картка племінної матки (ф. 2МОЛ, ф. 2СВ, ф. 2ОКЗ). До цього додається ветеринарне свідоцтво (форма №1) і довідка про стан здоров'я, відтворної здатності та інших показників згідно вимог до донорів.

На плідників, сім'я яких використовувалось для осіменіння донорів, заповнюється картка (ф. 1МОЛ, ф. 1СВ, ф. 1ОКЗ) або племсвідоцтво.

Для генетичного контролю походження потомства у картках племобліку відмічають групи крові тварин. Оперативний облік робіт, безпосередньо зв'язаний з технологією трансплантації ембріонів, здійснюється за допомогою спеціальних карток донорів, реципієнтів та трансплантантів. Картка донора і реципієнта заповнюється при відборі тварин на основі даних первинного зоотехнічного племінного обліку, клінічної і гінекологічної диспансеризації, а також при огляді і ректальному контролі статевих органів.

У картці відмічається використання кожного елементу технології трансплантації ембріонів.

Статева охота, осіменіння донора

Виявляють донора в охоті і осіменяють. Записують дату, час початку і закінчення охоти, інтенсивність її прояву у балах: прихована – 0, слабо виражена – 1, добре – 2, бурна – 3, наявність тички або її відсутність, стан слизу (прозорість, присутність домішок) і дату осіменіння.

Видобування ембріонів. У графу “Реакція яєчників” заносять дані ректального дослідження на 6-7 день після першого осіменіння до початку вимивання ембріонів, розмір яєчника, кількість функціонуючих жовтих тіл і фолікулів.

Якісну характеристику жовтих тіл (ЖТ) позначають хрестиками:

- ЖТ +++ – при пальпації виявляється розмір більше 1 см;
- ЖТ ++ – середніх розмірів від 0,5 до 1 см;
- ЖТ + – слабо виявляються менше 0,5 см.

Всі виявлені відхилення статевих органів від норми відмічають у примітках. У характеристиці ембріонів відмічають, який ембріон пересаджують (свіжий, після культивування чи заморожування).

За результатами морфологічної оцінки відмічають стадію розвитку ембріона і позначають символами МоI, МоII, БлI, БлII. Якість ембріонів додатково позначають хрестиками:

- МоI+++ – рання морула відмінної якості;
- МоI++ – рання морула доброї якості;
- МоI+ – рання морула середньої якості.

Також ведеться облік і реєстрація робіт у робочих журналах, які наведені нижче:

- обліку використання донорів;
- гормонального викликання поліовуляції у донорів;
- видобування, оцінки якості і використання ембріонів;
- кріоконсервація і використання ембріона;
- облік (реєстрація) результатів пересадки ембріонів.

Вся інформація у процесі роботи заноситься у карту та журнали з відміткою дати та прізвища виконавця роботи. За наслідками роботи за кожний місяць та рік складається звіт з аналізом роботи лабораторії, пункту по основним елементам технології та економічній ефективності застосування метода трансплантації у виробництво.

5. Мікрохірургічне ділення ембріонів

Ефективність трансплантації ембріонів значно зростає при використанні методів мікрохірургічного ділення зародків. Ці методи дозволяють в 1,4-1,6 разів збільшити вихід телят від високоцінних батьків, одержати монозиготних близнюків, генетичних хімер, а також клонування ембріонів.

У початковій стадії дроблення бластомери тотипотентні, т.п. кожний бластомер може розвиватись в окремий зародок. Для мікрохірургії відбирають ембріони тільки відмінної якості, класифіковані як пізні морули або ранні бластоцисти.

Для роботи по діленню ембріонів необхідні спеціальні мікроінструменти, прилади та пристрої. Мікроголки та деякі види мікроножів виготовляють зі скляних товстостінних або суцільних заготовок. Різні види мікропіпеток виготовляють з тонкостінних капілярів. Виготовлення мікроінструментів проводять за допомогою мікрокузень.

Основні мікроінструменти для маніпуляцій з ембріонами – це фіксуючі мікропіпетки, мікропіпетки для переносу половинок та четвертинок зародку, ін'єкційні піпетки, скляні мікроголки, металеві та скляні мікроножі. При діленні ембріону в вертикальному напрямку використовують мікроголку або металевий ніж, при горизонтальному напрямку – скляний або металевий трикутної форми. Металеві ножі можна довго використовувати, але скляні більш гострі, прозорі і не кидають тінь на ембріон під час маніпуляцій з ним.

Під час ділення ембріона часто відбувається пошкодження деяких бластомерів, що зумовлено безпосереднім пошкодженням мікроножем або мікроголкою, а також з'єднання бластомерів між собою і прилипання їх мембран до інструментів. Встановлено, що чим більша величина перевітелінового простору, тим менше пошкоджується бластомери. Кількість пошкоджених бластомерів знижується, якщо при діленні ембріона використовують силіконізовані мікроголки і мікроножі.

При діленні ембріон не розрізають, а розділяють, роз'єднують бластомери для чого мікрохірургічні інструменти вводять у зародок повільно з перервами по часу на 8-20 сек, дозволяючи клітинам по можливості відхилитись від ділячого інструмента.

Ділення ембріонів краще проводити в охолодженому розчині Дюльбекко, тому що при температурі середовища вище 20°C клітинні мембрани стають більш липкими, це збільшує прилипання половинок і четвертинок ембріона до мікропіпетки, мікроножа.

Мікрохірургічні роботи здійснюють у стерильних боксах в камері або чашці Петрі в ФСБ з 20% фетальною сироваткою під вазелиновим маслом.

Використовують при роботі пневмоманіпулятори під контролем мікроскопа з збільшенням – 80-100 кратністю.

В практиці застосовують такі основні 3 методи ділення ембріонів корів-донорів:

1. Ембріон присмоктують до фіксуєної мікропіпетки. З протилежного боку мікроножем або мікроголкою надрізають прозору оболонку і вводять в розріз мікропіпетку для маніпуляцій. Шляхом ін'єкції невеликого об'єму розчину виштовхують зародок з оболонки. На дні камери мікроножем або голкою ембріон ділять по вертикалі на дві рівні частини.
2. Ембріон фіксують мікропіпеткою. З протилежної сторони горизонтальним рухом мікроножа розрізають частину прозорої оболонки і ділять ембріон на дві групи клітин. Після цього в розріз вводять мікропіпетку для маніпуляцій, присмоктують і видаляють одну половинку.
3. Нефіксовану морулу або бластоцисту ділять по вертикалі на дні камери або у чашці Петрі разом з прозорою оболонкою на дві половинки.

Для розділення пізньої морули на 4 частини зародок спочатку ділять на дві половинки, після чого кожний напівембріон поза прозорою оболонкою ділять по вертикалі на дві частини. При проведенні маніпуляцій кут нахилу мікропіпеток і мікроголок відносно основи камери повинен бути 6-12°. Процес вертикального ділення зародка з прозорою оболонкою і без неї здійснюють шляхом повільного, з паузами по часу опускання мікроголки або мікроножа. При цьому не слід допускати рух ділячого інструмента вперед–назад, тому що це призводить до скручення половинок і пошкодження бластомерів. При діленні ембріона мікроголкою її краще розміщати так, щоб ділення проходило в тонкому місці, а кінчик голки повинен виступати за ембріон.

Ділення бластоцист здійснюють таким чином, щоб внутрішня кліткова маса та трофобласт були розділені рівно між кожною половиною ембріону.

Прозора оболонка не є необхідною умовою подальшого розвитку половинок ембріонів на стадії пізньої морули та бластоцисти. Але напівембріони, розміщені в оболонку, краще ідентифікуються під мікроскопом, менше прилипають до стінок піпетки і менше травмуються при пересадці реципієнтам. Прозора оболонка важлива при пересадці та подальшому розвитку четвертинок ембріону. Вживаємість заморожено-відтаяних половинок 7-денних ембріонів значно підвищується, якщо ембріони розміщують в свою або чужу прозору оболонку.

Прозору оболонку одержують від дегенерованих зародків, не запліднених яйцеклітин або ооцитів, виділених з антральних фолікулів яєчників корів. Щоб одержати порожню оболонку – ембріон або яйцеклітину присмоктують до фіксуєної мікропіпетки, а з протилежної сторони

мікроножем або мікроголкою надрізають прозору оболонку і звільняють від вмісту. Далі присмоктують до мікропіпетки напівембріон та через розріз в прозорій оболонці вводять його в середину.

Після ділення частки ембріонів оцінюють під мікроскопом та морфологічно нормальні половинки та четвертинки зародків або пересаджують, або культивують у поживному середовищі від 30 хвилин до 24 годин для визначення здатності напівембріону до компактизації та розвитку поза організмом.

Половинки краще пересаджувати після недовгої культивації – 1-2 години при 37,5°C в розчині Дюльбекко з 20% фетальною сироваткою і антибіотиками. За цей час проходить компактування напівембріону і в залежності від ступеня компактизації рівномірні половинки класифікують:

- відмінні – закруглені;
- добрі – частково закруглені;
- умовно придатні – не закруглені.

Культивування впродовж 16-20 годин призводить до утворення морфологічно нормальних бластоцист із роширеннями зі порожниною, клітинами трофобласту.

Трансплантація розділених ембріонів проводиться двом реципієнтам в роги матки або дві половинки пересаджують одному реципієнту в 1 ріг чи в два роги.

Контрольні питання:

1. Опишіть підготовку обладнання та середовища для оцінки ембріонів.
2. Опишіть Харківську технологією пошуку ембріонів.
3. Опишіть Англійську технологією пошуку ембріонів.
4. Яким чином реєструють статеву охоту, осіменіння донора?
5. Якісна характеристика жовтих тіл.
6. Опишіть основні методи ділення ембріонів.

Лабораторна робота № 5 «Зберігання ембріонів»

План:

1. Підготовка обладнання та середовищ.

2. Відбір ембріонів до зберігання.
3. Заморожування ембріонів.
4. Розморожування ембріонів різними методами.

1. Підготовка обладнання та середовищ

Передумовою кріобіологічної технології ембріонів є принцип зберігання ізольованих клітин у суспензіях, наприклад, сперміїв, еритроцитів, лімфоцитів і різних ліній культивованих клітин. Проте різним типам і колоніям клітин властивий свій режим охолодження та відтаювання, і вони можуть бути змінені відповідно до специфіки клітини.

Для уникнення кристалізації внутрішньоклітинної води до складу середовища додають кріопротектори – діметилсульфоксид (ДМСО) чи гліцерин, а щоб не допустити осмотичних зрушень – штучно стимулюють кристалізацію на певній стадії. Проте саме введення до складу середовища з ембріонами кріопротектора, як і його видалення, може викликати осмотичні зрушення. Тому це насичення (еквілібрацію) роблять поступово, поміщаючи ембріони на годинникових скельцях у чашках Петрі спочатку на 5...10 хв. у 0,25 М розчин ДМСО, тоді – в 0,5 М, 1,0 М і, нарешті, в 1,5 М розчин. У останньому розчині ембріони витримують 15...20 хв. Якщо кріопротектором є гліцерин, то спочатку ембріони поміщають на 10 хв. у 3,3-процентний його розчин, тоді на 14 хв. у 6,6%-процентний і, нарешті, на 30 хв. у 10-процентний розчин. Після розморожування ембріонів їх також відмивають від кріопротектора, переносячи поступово з розчинів з більшою концентрацією кріопротектора у менш концентровані розчини.

2. Відбір ембріонів до зберігання

Оптимальною стадією для заморожування ембріонів великої рогатої худоби є рання бластоциста, ембріонів овець і кіз – пізня морула чи рання бластоциста, ембріонів свиней – бластоциста. Краще переносять заморожування свіжі ембріони.

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.

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

3. Заморожування ембріонів

Нині ембріони заморожують методом програмного одноступінчастого заморожування, або ж одномоментним методом (вітрифікація).

Низькотемпературна консервація виконується для ембріонів сільськогосподарського значення. Воно дає можливість тривалий час зберігати цінний генетичний матеріал, відпадає необхідність в утриманні великих стад реципієнтів, значно спрощує експорт і імпорт ембріонів. Стає можливим зберігання генофонду рідкісних і зникаючих порід тварин.

Найважливіший фактор у процесі заморожування ембріонів – швидкість охолодження, яка для багатьох клітин становить 1°C за одну хвилину. Однак, оптимальна швидкість охолодження, що забезпечує максимальний рівень виживання для різних типів клітин, значно варіює для ембріонів різних видів тварин.

Великий вплив на життєздатність клітин виявляє і швидкість відтаювання, що залежить від швидкості охолодження. При швидкому охолодженні рівень виживання вищий за умовою швидкого відтаювання, повільне охолодження потребує повільного відтаювання.

Але за заморожування ембріонів нижче 0°C в них можуть виникати такі пошкодження: – створюються кришталіки криги; – зникає вода; – збільшується концентрація розчинених речовин у клітині (тобто осмотичний шок).

За дуже повільного заморожування кришталіки криги не утворюються, але спостерігається зневоджування клітини; швидке заморожування викликає утворення кристалів. Для вирішення цієї проблеми використовують кріопротектори, що поділяються на дві групи:

- внутрішні – це ті, що вводять усередину клітини для запобігання створенню криги. Як кріопротектор використовують диметилсульфоксид (ДМСО), гліцерин, етиленгліколь, етанол та ін.;
- зовнішні кріопротектори нездатні потрапляти всередину ембріона, але вони запобігають осмотичному руйнуванню клітини, коли під час відтаювання вода дуже швидко потрапляє всередину клітини, а внутрішній кріопротектор виходить назовні повільно, що викликає набухання і пошкодження ембріона. Як зовнішні кріопротектори використовують полівінілпірралідон (ПВП), а в основному розчин сахарози.

Слід підкреслити, що процес заморожування ембріонів є набагато складнішим від заморожування сперми, оскільки ембріони є багатоклітинними утвореннями. Тому дуже важлива роль відводиться підготовці ембріонів до заморожування, їх захисту від температурних та осмотичних пошкоджень.

У процесі заморожування ембріонів спочатку знижується температура в навколоклітинному середовищі, тут поступово збільшується кількість криги, в той час як в решті розчину зростає концентрація солей. Таким чином виникає різниця осмотичного тиску між позаклітинною та внутрішньоклітинною фазами, яка може бути зрівноважена шляхом віддачі клітинами води у позаклітинне середовище.

За наявності ембріонів відмінної якості можна використовувати спрощений спосіб насичення кріопротектором, за якого ембріони відразу переносять у 1,0 М або 1,4 М розчин гліцерину і витримують до 30 хвилин.

Закінчивши насичення ембріонів кріопротектором, їх розфасовують по 1...4 шт. у пробірки, ампули чи пайєти для заморожування, яке проводять одно- чи двоетапним методом, повільно чи швидко. У пайєти ембріони поміщають у такій послідовності: середовище–повітря–середовище з ембріоном – повітря – середовище (рис. 1). Кожен стовпчик повинен займати в пайєті до 1...2 см довжини. Один край пайєти закривають зволуженим корком.

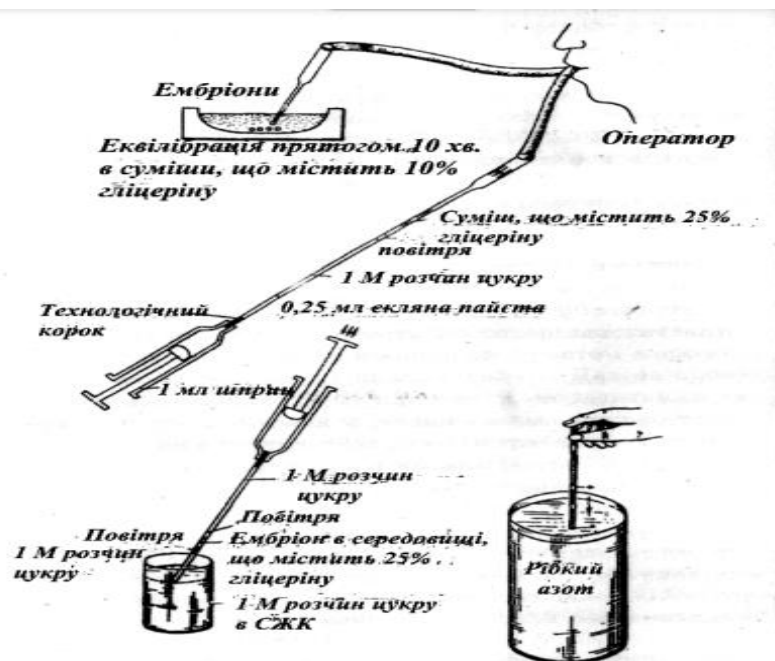


Рис. 57. Схема послідовності операцій заморожування ембріонів

Для зниження перепаду температур і уникнення осмотичних змін за температури 4...5°C до початку кригоутворення стимулюють кристалізацію, додаючи до розчину шматочок криги, кристалик йодистого срібла чи просто переохолоджений предмет (проколюють фольгу пінцетом з намерзлою на кінці краплею середовища і швидко торкаються ним поверхні рідини).

4. Розморожування ембріонів різними методами

Повільне розморожування

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

Швидке розморожування

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

Контрольні питання:

1. Що є передумовою кріобіологічної технології ембріонів?
2. Оптимальні стадії для заморожування ембріонів різних видів тварин.
3. Оцінка стану ембріонів.
4. На які групи поділяються кріопротектори? Опишіть їх.
5. Етапи розфасовування ембріонів.
6. Розморожування ембріонів різними методами.

Лабораторна робота № 6 «Пересадження ембріонів»

План:

1. Підготовка реципієнта до пересадження ембріонів.
2. Хірургічна та не хірургічна трансплантація ембріонів.
3. Техніка пересадження ембріонів нехірургічним способом.

1. Підготовка реципієнта до пересадження ембріонів

Застосовувані інструменти повинні бути чистими і стерильними. Заправляють пайети ембріонами так саме, як для заморожування, тобто спочатку набирають стовпчик середовища Дюльбекко довжиною 1,5-2,0 см, тоді такий же стовпчик повітря, далі засмоктують ембріон разом з середовищем, знову стовпчик повітря і нарешті стовпчик середовища.

Одягають на піпетку стерильний поліетиленовий чохол чи накривають її стерильною серветкою і зберігають у боксі в горизонтальному положенні до пересаджування. Підготовка тварини до операції і оперативні доступи до матки такі ж, як при вимиванні ембріонів.

2. Хірургічна та нехірургічна трансплантація ембріонів

Хірургічний спосіб

Застосують два способи. Перший спосіб – лапаротомія по білій лінії черева з використанням загального наркозу в положенні тварини лежачи на спині на особливому похилому операційному столі. Цей метод можна використовувати тільки для телиць. Здійснюють так як і при вимиванні ембріонів.

При лапаротомії по білій лінії живота знаходять в черевній порожнині яєчник з активним жовтим тілом; виводять за маткову зв'язку іпсілатеральний ріг матки назовні (в момент розслаблення) і тупою голкою (діаметром 1,0-1,5 мм) чи молочним катетером проколюють ріг матки приблизно в 5 см від матково-трубного з'єднання. Вводять в утворений отвір капіляр-піпетки з ембріоном в напрямку верхівки рога матки ближче до його матково-трубного з'єднання і зіштовхують вміст піпетки у просвіт рога матки, на його слизову оболонку. Таким же чином переносять другий ембріон в другий ріг матки. При цьому не можна торкатися стінок рога матки.

Закінчивши пересаджування, перевіряють, чи зайняла матка вихідне положення і вводять у черевну порожнину 250 мл фізрозчину з антибіотиками (по 500 тис. ОД пеніциліну та стрептоміцину в 50 мл новокаїну). Накладають триповерховий шов і залишають реципієнта під наглядом протягом двох тижнів.

Другий спосіб пересадки – менш трудомісткий, здійснюється в положенні стоячи шляхом розрізу черевної стінки у області голодної ямки, із застосуванням місцевої анестезії (5 мл 2-процентного розчину новокаїну і 0,6 мл комбелену); по лінії розрізу пошарово – 140 мл 2-процентного розчину новокаїну. Роги матки підтягують, як і при вимиванні ембріонів, стінку рогу матки проколюють тупою голкою, в цей отвір вводять скляну піпетку із

зародком, при цьому кінець піпетки спрямовують у бік верхівки рогу матки якомога ближче до місця його з'єднання з яйцепроводом.

Відкривши доступ до внутрішніх органів, вводять через розріз руку в черевну порожнину, захоплюють великим та вказівним пальцями маткову зв'язку протилежного рога матки, виводять його назовні, пересаджують в його просвіт ембріон (як в попередньому випадку), тоді аплікують ембріон в другий ріг матки. Опускають матку на місце, вводять в черевну порожнину антибіотики, накладають тришаровий шов та клейову пов'язку.

Після пересадки на розріз накладають три шари швів – на очеревину і прямий внутрішній м'яз, на косий зовнішній м'яз і підшкірну клітковину – кетгутум і на шкіру – лавсановою ниткою або шовком. Через 14 днів зовнішні шкірні шви знімають. При операціях по білій лінії черева використовують тільки кетгут, щоб уникнути повторної фіксації тварини. Ефективність хірургічного методу ТЕ великої рогатої худоби становить 60...70%. Слід зазначити, що хірургічний метод потребує великих витрат засобів; його застосування стримується складністю проведення операції у виробничих умовах через отримання травм унаслідок реакції м'язів і неможливість багаторазового використання реципієнтів.

Ефективність хірургічного пересаджування ембріонів висока, біля 60%, тому не випадково в багатьох зарубіжних центрах користуються переважно цим методом з лапаротомією в області голодної ямки. Правда нанесення тварині травми внаслідок резекції м'язів, неможливість багаторазового використання тварини, складності самої операції стримують широке застосування цього методу.

Нехірургічний метод

Нехірургічне пересаджування ембріонів. Перші досліді по нехірургічному пересаджуванню ембріонів проведено на початку 60-х років. Застосовувані сьогодні інструменти складаються в основному з металевого катетера та довгої капілярної трубки, в передній частині якої є приставка для поміщення ембріона в невеликій кількості середовища.

3. Техніка пересадження ембріонів нехірургічним способом

Спочатку реципієнтів піддають ректальному обстеженню – тільки тварини, які мають добре розвинене жовте тіло допускаються до використання. Телиць реципієнтів фіксують, зовнішні статеві органи обмивають теплою водою з милом, дезинфікують, роблять сакральну анестезію 2-процентним розчином новокаїну (5 мл). Пайєту заповнюють розчином Дюльбекко з антибіотиками і 10...20% фетальної сироватки теляти, який містить ембріони. Розчин із ембріонами відділяють двома міхурами

повітря від додаткової кількості розчину біля піжа пайєти і вільного кінця пайєти. Пайєту поміщають у наконечник катетера для ТЕ типу Касу. Катетер розміщують у захисний чохол і за температури +37°C доставляють до місця пересадки. Підготовлений до пересадки катетер вводять у піхву до шийки матки, проривають захисний чохол і під ректальним контролем проводять катетер через шийку матки в ріг на відстань не менше 5...7 см від тіла матки. Ембріони потрібно пересаджувати якнайдалі в ріг матки, але при цьому не пошкодити слизової оболонки рогу і шийки матки, якщо на катетері після витягування буде кров, ембріон швидше за все не приживиться. Переконавшись у правильності розташування катетера (щоб вихідний отвір у ньому не притискався до стінки рогу), необхідно натиснути на шток катетера, видавлюючи вміст пайєти разом із ембріоном у просвіт рогу матки. Катетер плавно виймають. Як правило, ембріон пересаджують у ріг матки зі сторони яєчника із жовтим тілом, при білатеральній пересадці аналогічним чином вводять інший катетер.

Аналогічним чином можна ввести інший катетер в другий ріг матки і зробити так зване білатеральне (двостороннє) пересаджування ембріонів, хоча приживлення їх в контрлатеральному розі буває дещо нижчим. М. І. Сергєєв отримував при таких пересаджуваннях 55-60% народжень двійнятами.

Контрольні запитання:

1. Вимоги до інструментів при підготовці реципієнта до пересадження ембріонів.
2. Охарактеризуйте хірургічний та нехірургічний спосіб трансплантації ембріонів.
3. Негативні сторони хірургічного способу.
4. Техніка пересадження ембріонів не хірургічним способом.
5. Охарактеризуйте білатеральне пересаджування ембріонів.

Лабораторна робота № 7 «Культивування та запліднення *in vitro*»

План:

1. Середовища для культивування та вимоги до них.
2. Отримання фетальної сироватки.
3. Отримання фолікулів та яйцеклітин з яєчників забитих тварин.
4. Капацитація сперми.
5. Запліднення та культивування *in vitro*.

6. Оцінка ооцитів, яйцеклітини, зигот та ембріонів.

1. Середовища для культивування та вимоги до них

Після витягнення клітин із тканини або організму й переміщення їх до культури, культуральне середовище повинно забезпечувати всі зовнішні умови, які клітини мали *in vivo*. Це сприяє виживанню клітин, їхній проліферації й диференціації. Позаклітинне середовище повинно забезпечувати клітини поживними і гормональними факторами, тобто володіти всім необхідним для росту й виживання клітин.

Культури клітин тварин і людини висувають певні вимоги до рідкої (поживне середовище), газоподібної (концентрація газів) і твердої (поверхня субстрату) фази. Поживне середовище – це розчин певного складу, до якого додаються компоненти нез'ясованого біологічного походження (добавки плазми, сироватки крові, екстракти тканини й т.ін.). Основу поживних середовищ становлять сольові розчини. Мінеральні компоненти в цих розчинах підібрані так, що розчин виконує буферні функції, підтримуючи постійний кислотно-лужний баланс середовища в процесі культивування. Сталість *pH* середовища є одним з головних вимог умов культивування.

Для приготування поживних середовищ звичайно використовуються **сольові розчини Ерла й Хенкса**. Ці розчини, як і фосфатно-сольовий буфер Дульбекко й Фогта використовуються також для зрошення й промивання клітин за пасажування культур, виділення клітинних ліній та інших маніпуляцій з культурами клітин. Важливою умовою культивування є також осмотичний тиск. Він визначається числом молів осмотично активних часток (йонів і нейонізованих молекул) розчинених речовин на 1 кг розчинника (осмоляльність) або на 1 літр розчину (осмолярність). У розведених водяних розчинах ці величини близькі.

Стандартні середовища для ведення культур тваринних клітин. Середовища Ігла MEM (minimal essential medium) і BME (basal medium, Eagle). Частіше використовується MEM. Воно містить мінеральні речовини, амінокислоти (13 незамінних), 6 водорозчинних вітамінів, холін й інозит, що виконують роль вуглеводного субстрату. MEM використовується тільки із сироваткою, тому що в ньому відсутні біотин, вітамін B₁₂, йони заліза та мікроелементи. Основою є розчин Ерла.

Середовище Дульбекко DME або DMEM (подвійна модифікація середовища Ігла). Використовується за культивування клітин різних типів, у тому числі нетрансформованих клітин і гібридом. Є основою для безсироваткових середовищ. Містить подвійну концентрацію амінокислот,

гліцин, серин, піруват, залізо. За використання цього середовища необхідний інкубатор з 10% концентрацією CO₂.

Середовище Іскова IMDM – модифікація середовища Дульбекко. До нього додано незамінні амінокислоти, біотин, вітамін B₁₂, селеніт натрію. До середовища введено HEPES і зменшено концентрацію NaCl і NaHCO₃. Середовище без сироватки звичайно використовується для культивування лімфоцитів і кровотворних клітин.

Середовище МакКоя 5А і серія середовищ RPMI. Середовище МакКоя 5А розроблено у 1958 році для підтримки клонального росту клітин карциносаркоми Уолкера 256 за наявності сироватки, та в наступному – інших первинних культур і різних клітинних ліній. Виробляється в модифікації Івката й Грейса (RPMI) і призначене для культивування лейкоцитів за наявності сироватки, часто застосовується і для культивування гібридом. Концентрація CO₂ в атмосфері за культивування становить 5%.

Середовище 199 розроблено у 1950 році для культивування фрагментів серця з ембріона курчати. Для середовища характерний широкий спектр поживних речовин і невисока їхня концентрація.

2. Отримання фетальної сироватки

Отримують із крові плодів корів і є головним компонентом багатьох поживних середовищ, необхідних для вирощування клітин у культуральному середовищі.

Фетальна теляча сироватка містить найрізноманітніші білки, не всі з яких відомі сьогодні. Ці білки також включають фактори росту, необхідні для культивування клітин у колбах культури клітин.

Процедура отримання речовини складається з видалення матки та майбутнього плоду. Плід витягується з оболонки і відрізається канатик. Потім голку встромляють у серце плоду і беруть кров, яку використовують для отримання сироватки.

3. Отримання фолікулів та яйцеклітин з яєчників забитих тварин

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 лапаратомії по білій лінії, який частіше застосовувався на телицях; - шляхом лапаратомії в області голодної ямки.

4. Капацитація сперми

Капацитація – це фізіологічні зміни в спермії до того, як він набуде здатності до запліднення.

Методи капацитації:

- Центрифугування;
- Метод Swim-up;
- Метод перколяції;
- Обробка розчином з високою іонною силою;
- Обробка фолікулярною рідиною корови.

5. Запліднення та культивування *in vitro*

Для запліднення поза організмом ооцитів кролів використовували свіжоотримані епідидимальні сперматозоїди кролів, які вилучали із придатків сім'яників (епідидимісів) у забитих статевозрілих самців. В лабораторію епідидиміси доставляли разом із сім'яниками впродовж 2-6 годин за температури +18...+25°C. Сперматозоїди одержували шляхом надрізання епідидимісів лезом безпечної бритви.

Для розрідження та дослідження рухливості свіжовилучених епідидимальних сперматозоїдів кролів використовують середовища: «TL MiniTub» (TL Sperm capacitation medium for swim-up, MiniTub – 1990/0020) та «TALP Ca²⁺ free». Зберігаються розріджені епідидимальні сперматозоїди кролів за температури +38,5°C у продовж 18 годин.

Відбір сперматозоїдів здійснюється методом спливання (swim-up). Використання методу «swim-up» та одноразового центрифугування дає змогу не тільки очистити сперматозоїди, а і відібрати найбільш життєздатні. При цьому застосовується одноразове 15-хвилинне спливання найбільш рухливих сперматозоїдів у флаконах, розміщених під кутом 45°. На дно похилених флаконів (4-6 шт.) під 1 мл модифікованого середовища Тіроде (TALP) без іонів Ca²⁺ розміщували 0,2 мл суспензії сперматозоїдів. Потім обережно відбирали поверхневий шар середовища. Відібрану суспензію з рухливими сперматозоїдами центрифугували при 3100 об/сек. (900 g) протягом 5 хвилин, відбирали рідину до осаду і розбавляли осад свіжим середовищем TALP без іонів Ca²⁺ до концентрації 1-5×10⁷ сперматозоїдів/мл.

Визначення концентрації сперматозоїдів здійснювали за допомогою камери Горяєва. Підрахунок сперматозоїдів проводили на столику мікроскопа за допомогою камери Горяєва при збільшенні у 200-400 разів. Сперматозоїди

підраховували по діагоналі в 5 великих квадратах сітки (80 маленьких). Кількість клітин в 5 великих квадратах додавали. Враховували лише ті сперматозоїди, головки яких знаходились в межах квадрата.

6. Оцінка ооцитів, яйцеклітини, зигот та ембріонів

Вилучені із антральних фолікулів яєчників ооцити, залежно від стану кумулюса та ооплазми, розподіляють на чотири групи:

I група – ооцити, оточені щільним багат шаровим кумулюсом, із однорідною невакуолізованою ооплазмою – найкращі для культивування поза організмом;

II група – ооцити, оточені розпушеним шаром кумулюса та однорідною невакуолізованою ооплазмою – придатні до культивування поза організмом;

III група – ооцити, які частково втратили кумулюс, але з невакуолізованою однорідною ооплазмою – умовно придатні до культивування поза організмом;

IV група – атретичні, денудовані, з вакуолізованою ооплазмою, тобто ооцити, які непридатні до подальшого розвитку – не придатні до культивування в умовах *in vitro*.

Контрольні питання:

1. Охарактеризуйте сольові розчини Ерла й Хенкса.
2. Охарактеризуйте стандартні середовища для ведення культур тваринних клітин.
3. Охарактеризуйте середовище Дульбекко DME або DMEM (подвійна модифікація середовища Ігла).
4. Охарактеризуйте середовище Іскова IMDM – модифікація середовища Дульбекко.
5. Охарактеризуйте середовище МакКоя 5A і серію середовищ RPMI.
6. Яким чином отримують фетальну сироватку новонароджених?
7. Назвіть основні методи капацитації сперми.
8. Назвіть групи оцінки ооцитів.

Лабораторна робота № 8 «Техніка отримання клонів»

План:

1. Отримання бластомерів.
2. Проведення енуклеації яйцеклітин і зигот.

3. Мікрохірургічні методи отримання ядер бластомерів та їх пересадження.

1. Отримання бластомерів

Частота злиття ізольованих бластомерів великої рогатої худоби з енуклеюваними ооцитами корів залежить від стадії розвитку ембріона. Показник злиття був вірогідно вищим у тому разі, коли для пересадження ядер використовували 16- і 32-клітинні ембріони порівняно з ембріонами на стадії 2-х і 4-х клітин (28,9; 25,0; 4,6 і 9,7%, відповідно). Установлено, що на ефективність злиття клітинних систем і розвиток ембріонів великої рогатої худоби до морули бластоцисти впливає вік яйцеклітини-реципієнта – частота формування реконструйованих бластоцист була значно вищою за злиття бластомерів 5,5-денних морул з енуклеюваними ооцитами, що культивувалися *in vitro* протягом 36 годин, ніж протягом 28, 32 і 40 годин. Продемонстровано можливість використання як джерела ядер 16-48-клітинних морул великої рогатої худоби, отриманих *in vivo* і далі кріоконсервованих, а також морул, отриманих *in vitro*. Частота злиття, дроблення і формування бластоцист для свіжих ембріонів, отриманих *in vivo*, заморожено-відтаяних ембріонів, отриманих *in vivo*, і ембріонів, отриманих *in vitro*, становила 80,0; 75,4 і 30,2%; 74,0; 64,9 і 7,1%; 84,5; 70,7 і 22,6%, відповідно.

2. Проведення енуклеації яйцеклітин і зигот

Ооцити добувають із яєчників і очищують від клітин кумулюсу. У подальшому поміщають на предметне скло у краплю середовища Дюльбекко і фіксують мікроприсоскою. Мікроножем, зробленим із леза бритви, трохи надрізають зону пелюциду, до якого підводять скляну мікропіпетку діаметром 50...70 мкм і виймають ооцит із прозорої оболонки. Одержані таким чином порожні зони пелюцида зберігають у середовищі Дюльбекко за температури +4,0-5,0°C.

Прозора оболонка є складним біохімічним і антигенним комплексом позаклітинних глікопротеїнів, що оточують не тільки ооцити, а й доімплантаційні зародки. Прозора оболонка є потенційною іммуноконтрацептивною мішенню, адже антитіла проти неї повністю пригнічують запліднення як *in vitro*, так і *in vivo*. У свиней прозора оболонка складається з 4-х глікопротеїнів (ZP1 - 82000, ZP2 - 61000, ZP3 - 55000 і ZP4 - 21000). У яйцеклітинах свиней переважає ZP3, цей глікопротеїн ізольований і очищений хроматографічно, його використовують для отримання протизаплідних вакцин.

Прозора оболонка розчиняється проназою, трипсином, хімотрипсином та іншими протеолітичними ферментами (у хом'яків і мишей – усіма цими ферментами, у корів – тільки проназою), та її стійкість до дії цих ферментів суттєво зростає після запліднення. Вважають також, що стійкість прозорої оболонки зумовлена часом перебування яйцеклітин у яйцепроводі самки (найшвидше перетравлюються прозорі оболонки незрілих яйцеклітин, найдовше – оболонки доімплантаційних зародків).

Відомо також, що перебування ооцитів (незрілих або дозрілих *in vitro*) у середовищах без сироватки призводить до затвердіння прозорої оболонки, що викликає підвищення стійкості її до протеолітичних ферментів, а також до значного зниження частоти запліднення таких яйцеклітин. За штучної активації розчинність прозорої оболонки трипсином або проназою погіршується, але меншою мірою, ніж після запліднення.

3. Мікрохірургічні методи отримання ядер бластомерів та їх пересадження

Пересадки ядер у ссавців почалися пізніше, в 80-х роках. Це було пов'язано з технічними труднощами, оскільки зигота ссавців має невеликі розміри. Наприклад, діаметр зиготи миші приблизно 60 мкм, а діаметр заплідненої яйцеклітини жаби близько 1200 мкм, тобто в 20 разів більше.

Незважаючи на перераховані труднощі, перші повідомлення про отримання клонів мишей, ідентичних донору, з'явилися вже в 1981 році. В якості донора були використані ембріональні клітини однієї з ліній мишей, взяті на стадії бластоцисти. Через кілька років Дж. Мак Грат і Д. Солтер також досягли успіху.

У цих експериментах клони мишей вдавалося отримати лише в тому випадку, якщо трансплантували ядра ембріонів на стадії не пізніше 2 бластомерів. Ці та багато інших даних показують, що в ембріогенезі у мишей клітинні ядра рано втрачають тотипотентність, що пов'язано очевидно, з дуже ранньої активацією геному зародка – вже на стадії 2-х клітин. У інших ссавців, зокрема, у кроликів, овець і великої рогатої худоби, активація першої групи генів в ембріогенезі відбувається пізніше, на 8-16-клітинній стадії.

Аж до середини 90-х років питання про використання дорослих ссавців в якості донорів ядер клітин практично не ставилося, оскільки вчені-біологи займалися головним чином клонуванням ембріонів домашніх тварин, причому експерименти в цій області і по цю пору проходять вельми непросто і з високим рівнем невдач.

Тому, воістину сенсацією стала історія з клонуванням в 1996 році знаменитої нині овечки Доллі в шотландській фірмі PPL Therapeutics.

Колектив вчених, очолюваний Єном Уїлмут, продемонстрував, що їм вдалося, використовуючи соматичні клітини дорослої тварини, отримати клональну тварину вівцю по кличці Доллі.

Однак цьому передувала велика робота худоба. Ще в 1986 році Уиландсин показав, що ембріони овець на 16-клітинній стадії розвитку зберігають тотіпотентність. Реконструйовані яйцеклітини, які містять ядра бластомерів 16-клітинних зародків, розвивалися нормально до стадії бластули в перев'язаному яйцепровід вівці, а після звільнення з агару, пересаджували в матку вівці – другого реципієнта – ще на 60 днів. В іншому випадку донорами служили ядра 8-клітинних зародків і були отримані три живих ягняти, фенотип яких відповідав породі вівці донора.

У 1989 році Сміт і Уїлмут трансплантували ядра клітин 16-клітинного ембріона і ранньої бластули в позбавлені ядра незаплідненої яйцеклітини овець. У першому випадку було отримано два живих ягняти, фенотип яких відповідав породі овець – донорів ядер. У другому випадку один повністю сформувався, а інший загинув під час родів.

Його фенотип також відповідав породі-донору. Автори вважали, що в ході диференціювання ембріональних клітин відбувається інактивация деяких важливих для розвитку генів і в результаті ядра бластули вже не можуть репрограмуватися в цитоплазмі яйцеклітини і забезпечити нормальний розвиток реконструйованого зародка.

Так само, можна використовувати тварин для того щоб тестувати на них нові види ліків і звичайну продукцію, призначену для людини. Велика перевага використання клонованих тварин для перевірки на пігулки полягає в тому, що всі вони є генетично ідентичними, що означає, що їхня реакція на лікарські засоби повинна бути більш менш схожою, ніж у тварин з різним генетичним набором.

Іншою причиною для клонування може служити те, що існують популяції тварин, які стоять на межі вимирання. У 2001 році саме з цієї причини учені зробили перший клон, підданого небезпеці вимирання – азіатського вола.

Дитинча, який розвивався в матці у своєї мами-замінника (сурогатна) загинув всього лише через три дні після свого народження. Цей досвід був перейнятий і вже через два роки, у 2003 році, учені створюють клон особини вола, який так само стоїть на межі зникнення.

Звичайно, клонування має свої перспективи. Адже генна інженерія розвивається і можливо у майбутньому вчені зведуть смертність клонів до

мінімуму, зменшать затратність даного процесу. Наразі тема «клонування» залишається «завислою у повітрі». У більшості країн клонування, навіть вимираючих тварин, заборонено через проблему етичності. Україна не так критично ставиться до клонування організмів за добрих намірів. У Китаї клонування тварин використовують на повну для збільшення кількості великої рогатої худоби, а також домашніх улюбленців. Проте, розробки і дослідження у всьому світі ведуться з обережністю, аби не порушити етичні права та норми суспільства.

Контрольні питання:

1. Що впливає на ефективність злиття клітинних систем і розвиток ембріонів великої рогатої худоби?
2. Яка частота злиття, дроблення і формування бластоцист отриманих *in vivo* та отриманих *in vitro*?
3. Яким чином проводять енуклеацію яйцеклітин?
4. Чим розчиняється прозора оболонка?

Лабораторна робота № 9 «Трансгенні тварини із заданими ознаками»

План:

1. Трансгенні тварини стійкі до захворювань.

2. Трансгенні тварини з поліпшеним складом молока.
3. Трансгенні тварини, які продукують біологічно активні речовини медичного і технологічного призначення.
4. Ксенотрансплантація.

1. Трансгенні тварини стійкі до захворювань

Резистентність – це спадкова генетично зумовлена сприйнятливність тварин до певних мікроорганізмів, вірусів, шкідників або токсинів. Тому можливо отримати трансгенних тварин з чужорідними генами, що забезпечують несприйняття цих тварин певних захворювань. Вторгненню і розмноженню збудників запобігають, головним чином, імунні механізми і експресія генів, що відповідають за синтез таких речовин, як інтерферони, нейропептиди, гормони й інтерлейкіни, ін.

Досліджується можливість отримання трансгенних тварин, які здатні збільшити вміст лактоферину в тканинах молочної залози з метою підвищення резистентності до маститу.

Значний інтерес викликають дослідження щодо отримання трансгенних тварин з генами антисмислової РНК (асРНК). Експресія її у клітинах спричиняє наступну гібридизацію із смисловою РНК вірусу і, відповідно, інгібування реплікації вірусного геному. Створені трансгенні кролі, кури, велика рогата худоба з геном асРНК проти вірусу лейкозу, стійкі до зараження лейкозом.

2. Трансгенні тварини з поліпшеним складом молока

Окремою метою трансгенезу великої рогатої худоби є зміна вмісту в молоці різних його компонентів. Її можна досягнути як кількісно, за рахунок зміни співвідношення компонентів молока, так і якісно, шляхом додавання інших компонентів, що відсутні у складі природного молока, але вони посилюють його поживну цінність. У молоці містяться чотири основні компоненти: жир, білок, лактоза і транспортний компонент.

З економічної точки зору існує інтерес збільшити вміст казеїну в молоці, що поліпшує процеси виробництва сиру. Вважають, що молочна залоза обмежена у здатності синтезувати білок. Будь-яке додаткове створення білка компенсується зменшенням кількості інших білків молока. Враховуючи це, є другий можливий шлях збільшення рівня казеїну, а саме, гальмування виробництва білків, що менш корисні. Для цього підходить β -лактоглобулін, який існує лише в молоці жуйних і є основним алергентом молока корови. Зменшення його кількості поліпшує склад молока. Для вирішення цієї проблеми використовували асРНК.

Зменшення кількості лактози в молоці також було б корисним і не лише для людей, які не здатні розщеплювати її через недостатній синтез ферменту лактази, а й для молочної промисловості, оскільки збільшило б ефективність виробництва сиру. Проблема була вирішена за рахунок створення трансгенних корів, у молочній залозі яких відбувалась експресія лактази, що гідролізувала лактозу безпосередньо в тканинах вимені.

Отримані трансгенні вівці з геном хімозину, які продукують з молоком у середньому 200...300 мг ферменту хімозину на 1 л молока. Це джерело отримання хімозину – основного компонента для виробництва сиру – може замінити традиційний спосіб отримання його з сичугу молочних телят і ягнят, але його вартість буде в 5...10 разів меншою.

Молоко, поряд зі своєю цінністю як продукту, може використовуватися і як транспортний засіб для інших речовин, що збільшують не лише його поживні, а також і функціональні властивості. Наприклад, лактоферин, кислий білок молока людини з бактеріостатичними властивостями, що посилює адсорбцію заліза. Він міститься в молоці корів у незначній кількості і з його збільшенням можна досягнути декілька цілей. Оскільки він поліпшує адсорбцію заліза, то за його рахунок можна захистити збереженість нащадків, крім того, він контролює розмноження бактерій.

Синтез молочною залозою лізоциму не тільки забезпечує антибактеріальний вплив, а й зменшує ймовірність захворювання на мастит, викликає специфічний пасивний імунітет у новонароджених. Крім того, він також сприяє збільшенню виходу сиру, оскільки пов'язаний з казеїнами.

Таким чином, внаслідок секреції білків людини в молоко корів можливо зробити його більш адекватним для використання людиною. Включення лактоферину, лізоциму і імуноглобулінів людини мають додаткову терапевтичну користь.

3. Трансгенні тварини, які продукують біологічно активні речовини медичного і технологічного призначення

Трансгенні тварини – біореактори. Біореакторами називають організми, продуценти лікарських білків. Біореакторами можуть бути будь-які живі організми – бактерії, гриби, рослини, тварини і, навіть, клітинні культури. У кожного з таких організмів-біореакторів є переваги й недоліки. Бактерії, наприклад, легко модифікуються методами генної інженерії, швидко розмножуються і їх зручно використовувати в промислових біотехнологічних установках. Таким методом роблять генно-інженерний інсулін людини – у цей час найбільш якісний з тих, що одержують промисловим способом інсулінів. Однак, для нормального функціонування білків людини дуже важливі ті зміни,

які відбуваються на післятрансляційному рівні: глікозилірування, ацетилювання, фосфорилірування, карбоксилірування й деякі інші перетворення. Більша частина біохімічних механізмів, що забезпечують ці процеси, відсутня у прокариот, і білки, синтезовані ними з матриць генів людини, не повністю ідентичні білкам із клітин людського організму. Інша складність пов'язана з виділенням і очищенням лікарського білка – бактеріальні клітини йдуть у переробку цілком, і тому важко позбутися всіх сторонніх домішок у кінцевому продукті. Трансгенні дріжджові культури й культури клітин Людини не мають цих недоліків, але продуктивність таких систем у цей час нижча за ту, що вже отримана в експериментальних трансгенних тварин. Незважаючи на активний розвиток біотехнології в останні десятиліття, основним джерелом багатьох необхідних фармакології лікарських білків людини є донорська кров. Це фактори зсідання крові – фібриноген, антитромбіни, альбумін, імуноглобуліни й інші білки, без використання яких важко уявити собі сучасну медицину. Достатня кількість якісних і дешевих лікарських білків людини могло б урятувати багатьох пацієнтів.

Найбільший прогрес у виробництві трансгенних продуктів був досягнутий у цілеспрямованій трансгенній експресії в епітеліальні клітини молочної залози і синтезі білків поряд з молоком. Структурний ген, що пов'язаний з промотором гена молочногo протеїну, в першу чергу, буде здійснювати експресію у клітинах молочної залози. Використання молока доцільне тому, що воно утворюється в організмі тварини у великій кількості, його можна надоювати за необхідністю без шкоди для тварини. Запропоновано новий термін *біофармінг*, який належить до процесу отримання з молока білків людини або фармацевтичних препаратів.

Одним з основних етапів у отриманні трансгенних тварин, які продукують гетерогенний білок з молоком, є ідентифікація промотору, що буде спрямовувати експресію у секреторній епітелій молочної залози. В наш час виділені промотори αS_1 -казеїну, β -казеїну, α -лактоальбуміну, β -лактоглобуліну і сироваткового кислого протеїну (WAP).

Стратегія цих робіт така: отримати трансгенну тварину, в якій чужий ген експресується в клітинах молочної залози й продукт роботи цього гена виділяється в молоко. Тоді одержання лікарського білка зведеться до процесу, що відомій людині вже багато тисяч років, – до доїння. Апаратами механічного доїння, звичайно, користуються, але є апарати, що дають можливість подоїти козу, вівцю, свиню, кролика й навіть мишу. Трансгенні тварини дозволять вирішити й ще одну проблему – проблему очищення лікарських білків. Навіть

якщо після очищення в препараті залишаться домішки, це будуть нетоксичні для людини білки молока.

4. Ксенотрансплантація

Трансгенні тварини можуть стати донорами органів і тканин для пересаджування людині. Основна проблема міжвидової трансплантації – це гіпергостре відторгнення. Воно пояснюється тим, що антитіла організму господаря зв'язуються з антигенними детермінантами на поверхні клітин пересаженого органу, виникає гостра запалювальна реакція (активація каскаду комплементу) і швидка втрата трансплантованого органу.

У природних умовах реакція запалювання блокується особливими білками (супресорами). Було зроблено припущення, що коли тварина-донор має один або декілька білків людини-інгібіторів запалювального процесу, то орган, який пересажено, буде захищений від первинної запалювальної реакції.

Із цією метою вивели трансгенних свиней, які несуть різні людські гени інгібітору комплементу. Клітини однієї із цих тварин виявилися зовсім нечутливими до компонентів системи каскаду комплементу. Попередні експерименти з пересадження органів трансгенних свиней приматам показали, що тканини пересаженого органу ушкоджуються рідше, а сам орган не відторгається трохи довше. Можливо, трансгенні свині, що несуть людський ген інгібітору комплементу й позбавлені основного поверхневого білка клітин свиней, що викликає найгостріше відторгнення, можуть стати джерелом органів для трансплантації людині.

Контрольні питання:

1. Що таке резистентність?
2. Роль молока як транспортного засобу для інших речовин.
3. Хто такі тварини-біореактори?
4. Опишіть стратегію роботи з одержання трансгенної тварини.
5. В чому проблема міжвидової трансплантації?

План:

1. Історія клонування.
2. Види клонування.

1. Історія клонування

Бурхливий розвиток біологічної науки за останні десятиріччя привів до створення декількох сучасних напрямів експериментальної біології, що поставили для вивчення принципово нові питання живої матерії, які вже найближчим часом можуть суттєво змінити деякі технології виробництва сільськогосподарської продукції, медичних і фармацевтичних препаратів. Одним з таких напрямів, що спирається на новітні досягнення ембріології, цитології, біологічного приладобудування та біотехнологічної промисловості, є клонування ссавців. Суть клонування полягає у принципово новому методі відтворення тварин, коли ембріон утворюється не шляхом запліднення жіночої статевої клітини чоловічою, а в результаті пересадки ядра з диплоїдним набором хромосом у яйцеклітину, з якої вилучено власний генетичний матеріал.

Уперше трансплантацію ядер соматичних клітин зародків до енуклеїованих клітин жаби здійснили американські дослідники Р. Бриггс і Т. Кінг у 1952 році. Учені, користуючись мікропіпеткою, видаляли ядра з яйцеклітин шпорцевої жаби, а замість них пересаджували ядра клітин ембріонів, що перебувають на різних стадіях розвитку. Проведені дослідження показали, що ядра ранніх ембріонів у стадії пізньої бластули й навіть ранньої гастрული володіють тотипотентністю й забезпечують нормальний розвиток ембріонів.

Більш ґрунтовні дослідження, що охоплюють не тільки амфібій, а й риб, а також дрозоділ, у 1962 р. були розпочато англійським біологом Дж. Гордоном. Він першим у дослідах з південноафриканськими жабами (*Xenopus laevis*) як донора ядер використав не зародкові клітини, а клітини епітелію кишківника плаваючого пуголовка, що вже цілком спеціалізувалися. Ядра яйцеклітин реципієнтів він не видаляв хірургічним шляхом, а руйнував ультрафіолетовими променями.

У подальшому Дж. Гордон разом з Пещення (1970) почали культивувати *in vitro* клітини нирок, легень та шкіри дорослих тварин і використовувати вже ці клітини як донори ядер. Майже 25% первинно реконструйованих яйцеклітин розвивалися до стадії бластули. При серійних пересадженнях вони розвивалися до стадії плаваючого пуголовка. У такий спосіб було показано, що клітини трьох різних тканин дорослого хребетного (*X. laevis*) містять ядра, які можуть забезпечити розвиток принаймні до стадії пуголовка.

У свою чергу М. Дж. Берардіно і Н. Хофнер (1983) використовували для трансплантації ядра клітин крові, що не поділяються та цілком диференційовані – еритроцити жаби *Rana pipiens*. Після серійного пересадження таких ядер 10% реконструйованих яйцеклітин досягали стадії плаваючого пуголовка. Ці експерименти показали, що деякі ядра соматичних клітин здатні зберігати тотипотентність.

У 1985 р. була описана технологія клонування кісткових риб, що розроблена радянськими вченими Л.А. Слепцовой, Н.В. Дабагян і К.Г. Газарян. Зародки на стадії бластули відокремлювали від жовтка. Ядра клітин зародків вприскували в цитоплазму незапліднених ікринок, які починали дробитися й розвивалися в личинки. Ці експерименти показали, що втрата ядром тотипотентності в процесі онтогенезу пов'язана не з втратою генів, а їхньою репресією. За культивування соматичних клітин *in vitro* частота тотипотентності ядер збільшується.

Пересадження ядер у ссавців почалися пізніше, у 80-х роках. Це було пов'язано з технічними труднощами, тому що зигота ссавців має невеликі розміри. Наприклад, діаметр зиготи миші приблизно 60 мкм, а діаметр заплідненої яйцеклітини жаби – 1200 мкм, тобто у 20 разів більше. Зигота корові трохи більша за зиготу миші, діаметр її становить 160 мкм, але пронуклеуси приховані яєчним жовтком, тому перед мікроманіпуляціями необхідна спеціальна обробка зигот.

Перші успішні експерименти з клонування сільськогосподарських тварин були проведені С. Уїлладсеном (S. Willadseri) у 1986 р. Він зливав без'ядерні яйцеклітини із бластомерами, виділеними з 8- і 16-клітинного ембріона вівці.

Дж. Робл і його співробітники у 1987 р. провели роботи з пересадження ядер великої рогатої худоби. Вони пересаджували до зигот каріопласти – чоловічий і жіночий пронуклеуси разом з цитоплазмою, що їх оточує, а також ядра 2-, 4- або 8-клітинних ембріонів корови. Реконструйовані зародки в цій роботі розвивалися тільки в тих випадках, коли до зигот пересаджували пронуклеуси: 17% таких зародків досягли стадії морули або бластоцисти. Два зародки були пересаджені іншому реципієнтові – у матку корови, і розвиток їх завершився народженням живих телят. Якщо як донорів використовували ядра 2-, 4- або 8-клітинних зародків, то реконструйовані яйцеклітини не розвивалися навіть до стадії морули.

Пізніше були й більш успішні роботи. Зокрема С. Уїлладсен (1989) повідомив, що йому вдалося отримати чотирьох генетично ідентичних бугаців голштинської породи пересадженням до реципієнтних яйцеклітин ядер бластомерів одного 32-клітинного зародка.

К. Бондіолі й співавтори (1990), використовуючи як донорів ядер 16-64-клітинні зародки корів, трансплантували 463 реконструйованих зародки в матку синхронізованих реципієнтів, було отримано 92 живих теляти. Сім з них були генетично ідентичні, являючи собою клон, отриманий у результаті пересадження ядер клітин одного донорського ембріона.

Експериментів з клонування свиней небагато. Успішні дослідження провели Р. Пратер зі співробітниками в 1989 р. Незначна кількість даних пов'язана з певними труднощами роботи із цим об'єктом.

У 1993-1995 роках група дослідників під керівництвом Я. Уілмута (Ian Wilmut) з Рослинського інституту отримала клон овець – 5 ідентичних тварин, донорами ядер яких була культура ембріональних клітин.

Я. Уілмут зі співавторами опублікував на початку 1997 року повідомлення, що в результаті використання донорського ядра клітини молочної залози вівці було отримано клоновану тварину – вівцю за кличкою Доллі.

Аналогічні експерименти здійснювали пізніше Т. Домінко (Tanja Dominko) і співробітники лабораторії Вісконсинського університету, які забезпечили клонування ембріонів із клітин шкіри вух дорослої рогатої худоби. Ембріони, генетично ідентичні корові, що пожертвувала клітини вуха, були пересаджені в матки корів-реципієнтів. Спостерігалася поступова загибель ембріонів, тому життєздатних телят не отримали. Причини поки що не встановлено.

У серпні 1997 року з'явилося повідомлення про те, що Алан Троунсон (Австралія) розробив технологію, яка дозволяє сформувати ембріон з 16, 32 або 64 клітин, а потім кожна з них може використовуватися для формування 16, 32 або 64 ідентичних ембріонів. Колектив дослідників на чолі з Аланом Троунсоном створив 470 генетично ідентичних ембріонів рогатої худоби від єдиної бластоцисти. Така технологія забезпечує безмежне джерело генетичного матеріалу для клонування.

2. Види клонування

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.

1. Як клітин-реципієнтів використовують або зрілі ооцити на стадії метафази II, тобто яйцеклітини, або зиготи. Технологія отримання клітин-реципієнтів полягає в тому, що після розрізу скляною голкою прозорої оболонки дозрілих до метафази II незапліднених яйцеклітин у частині полярного тільця, ооцити приєднували до розчину *PBS*, що містить 5 мкг/мл цитохалазину В.
2. Приблизно за годину з експозиції в середовищі з цитохалазином В полярне тільце з прилеглою ділянкою ооплазми видаляли всмоктуванням за допомогою піпетки для мікроманіпуляцій. Ефективним способом *елімінації* (вилучення) ядерних структур дозрілих *in vitro* ооцитів корів може стати також хімічна енуклеація.
3. 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.
4. 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, а 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.

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.

І справа зовсім не в технічній розробці методів клонування, а в тому, що структурно-функціональні зміни ядер у процесі індивідуального розвитку тварин досить глибокі: одні гени активно працюють, інші інактивуються й «мовчать», при цьому сам зародок являє собою своєрідну мозаїку статей розподілу таких функціонально різних генів. І чим організм більше спеціалізований, чим вищий підйом еволюційних сходів, на яких він стоїть, тим ці зміни глибші й суужніше оборотні.

Відомо, що в соматичних клітинах у ході їхнього розвитку хромосоми послідовно коротшають на своїх кінцях (тіломірах), у зародкових клітинах спеціальний фермент – теломераза добує, відновлює їх, тобто отримані дані знов-таки свідчать про істотні розходження між зародковими і соматичними клітинами. І отже, постає питання, чи здатні ядра соматичних клітин повністю й еквівалентно замінити ядра зародкових клітин у їхній функції забезпечення нормального розвитку зародка.

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.

Статистика свідчить, що вихід потомства від кількості проведених ядерних пересадок вкрай низький і для головних видів сільськогосподарських тварин становить: у свиней – 1%, у великої рогатої худоби коливається від 1% до 4%, у овець – 4%.

Контрольні питання:

1. Охарактеризуйте наукову сферу застосування клонування.
2. Охарактеризуйте виробничу сферу застосування клонування.
3. Опишіть першу трансплантацію ядер соматичних клітин.
4. Коротко охарактеризуйте ембріональне клонування.
5. Коротко охарактеризуйте клонування з застосуванням ембріональних стовбурових клітин.
6. Коротко охарактеризуйте соматичне клонування.

Практична робота № 2 «Одержання химерних тварин»

План:

1. Загальна характеристика.
2. Методи створення експериментальних химер.
3. Створення химерних лабораторних ссавців.
4. Створення химер сільськогосподарських тварин.

1. Загальна характеристика

Поняття химера (грец. *chimaira*) 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.

2. Методи створення експериментальних химер

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.

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'єкувати 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.

3. Створення химерних лабораторних ссавців

Першими створеними й ідентифікованими химерами були миші між лініями агуті і неагуті (чорна). Химери виявилися крапчастими, причому агуті (кремовий колір) і чорне забарвленням, перемішуючись, формували своєрідний візерунок (Mintz В., 1965). Надалі було показано, що в експериментальних химер, отриманих з пігментованої і непігментованої ліній, стрижні деяких шерстинок були повністю пігментовані, інші – зовсім позбавлені меланину, а треті – були плямистими. Таким чином, у забарвленні шерсті мишей проявляється дія батьківських генів з характерним різним ступенем проміжної експресії генів. Якщо химеризм стосується кількох локусів, що впливають на колір шерсті, за утворення пігменту відбуваються фенотипові взаємодії.

Одержання агрегаційних внутрішньовидових химер-мишей дозволило встановити, що в організмі химери є генотипово різні популяції клітин, тобто генетична мозаїка. Це дозволяє аналізувати механізм дії різних генів, особливо мутантних, у процесі онтогенезу ссавців (Конюхов Б.П., Платонов Е.З., 1985).

Химери-миші отримані ін'єкційним методом, використання якого поглибило знання в проблемі детермінації клітин в онтогенезі. Наприклад, показано, що чим пізніше стадія розвитку ембріона, від якого взята ВКМ для ін'єкції в бластоциль, тим менша ймовірність одержання химер, і, нарешті, на основі ін'єкційного методу було отримано нові дані для розкриття механізму диференціації й малігнізації (від лат. *malignus* – шкідливий, згубний, злоякісне переродження пухлини) клітин.

У зв'язку з цим можна відзначити, що при ін'єкції в бластоцисту ВКМ тератокарциноми, її клітини у разі інтеграції в ембріон втрачають ракові ознаки. Отже, пухлинні клітини під впливом нормальних ембріональних клітин перетворюються на нормальні. Ці дані мають велике значення за виведення химерних тварин, стійких до пухлинних захворювань.

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 господарськи важливі ознаки.

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.

4. Створення химер сільськогосподарських тварин

Успіхи, досягнуті в розробці методів створення химерних лабораторних ссавців, дозволили практично підійти до створення химер сільськогосподарських тварин. На початку 80-х років була спроба одержання химерних телят від корів *Bos taurus* і *Bos indicus*. У цих експериментах використовували агрегаційний метод, тобто ранні ембріони, що були на стадії морули, обробляли проназою, видаляли *in vitro* прозору оболонку і змішаний агрегат бластомерів культивували *in vitro*. Пересаджені коровам-реципієнтам химерні морули гинули (Sammer P.M. et al., 1983). Автори довели, що метод агрегації неприйнятний для одержання химерних тварин великої рогатої худоби, тому що важко видалити 5-процентною проназою зону пеллюциду. Крім того, ще немає надійного середовища для культивування *in vitro* 8-12-клітинних змішаних агрегатів бластомерів.

Із цих причин дослідники застосували ін'єкційний метод, увівши ВКМ бластоцисти донора в бластоціль реципієнтного ембріона. Ін'єкцію ВКМ робили за описаною раніше методикою R. Gardnera (1968). Ембріони культивували у фізіологічному розчині Дульбекко з буферним фосфатом і добавками біологічно активних речовин.

Внаслідок ін'єкції від 1 до 6 клітин 7-денних ембріонів виду *Bos taurus* у бластоціль виду *Bos indicus* народилося 7 телят, серед яких одне (SV 29) був ідентифіковано як химерне чотирьох батьків. Фенотипово воно не відрізнялося від однолітків, але за еритроцитарного типірування в нього було виявлено еритроцитарний антиген, типовий для *Bos taurus*. Автори припускають, що химерізм міг би бути й в інших телят, однак через відсутність відповідних маркерів їм не вдалося точно встановити цей факт.

Останнім часом були отримані міжвидові химери між вівцею і козою, яких назвали вівцекозами. Відомо, що вівця ($2n = 54$) і коза ($2n = 60$) не належать до близьких видів і між собою не схрещуються. Уперше таких химерних тварин вивели в 1984 р. у Великобританії (Fehilly C. et al., 1984) і у ФРН (Meinecke-Tillmans, Meinecke B., 1984).

C. Fehilly зі співробітниками для одержання міжвидових химер між вівцею і козою застосовували агрегаційний та ін'єкційний методи і реципрокні пересадження. Агрегаційним методом було отримано 6, а ін'єкційним методом 2 химери. Шерсть у таких тварин являла собою суміш вихідних видів, роги за будовою були як у кози, але закручені як у барана, проте екстер'єр відповідав одному із батьківських видів. Таким чином, у химер спостерігали мозаїчність тільки волосяного покриву. Цікавим є факт народження ягняти від кози й цапеняти від вівці. Ці так звані однокомпонентні тварини розвивалися з ін'єкційних химер.

У США в Каліфорнійському університеті від ін'єкції ВКМ бластоцисти кіз у бластоцисту овець було отримано овечо-козячі химери (Polzir V. et al., 1987). Двадцять дві химерні бластоцисти хірургічно трансплантували 12 вівцям-реципієнтам. Від 9 суягних овець було отримано 13 нащадків. За електрофоретичним аналізом крові і каріотипом десять тварин віднесли до вівці, одну – до кози і дві – до міжвидових овечо-козячих химер.

У 1987 р. в університеті штату Каліфорнія США за ін'єкційним методом отримано міжпородні химери вівці – між породами рамбулье і фінський ландрас. З 36 отриманих ягнят у 16 за методом аналізу груп крові і каріотипу було підтверджено химерізм.

У 1982 р. у ФРН ін'єкція хромосомально маркірованих клітин бластоцисти в нормальну бластоцисту великої рогатої худоби і наступне пересадження корові-реципієнтови химерної зиготи призвели до народження

химерної телички (Stranziger G., 1986). Чотири батьки, реципієнт і химерна теличка були досліджені цитогенетичними і біохімічними методами. У цієї телички за рядом ознак установлений химерізм. Автори довели ефективність ін'єкційного методу.

Пізніше у ФРН (1985) було отримано химерних телят після агрегації половинок 32-клітинних ембріонів від корів контрастних порід – швицької (бурої) і голштино-фризської. Із семи народжених телят у п'яти були відсутні ознаки химерізму, а в двох у фенотипі поєднувалася характерна масть вихідних порід – бура і чорно-строката.

У колишньому Радянському Союзі ін'єкційним методом виведено химерний бугаєць від чорно-рябої і червоної порід, що у фенотипі поєднує чорно-рябу масть із червоними плямами.

Таким чином, проведені експерименти показали можливість одержання химер (генетичних мозаїків) у тваринництві.

Химерні тварини не передають нащадкам характерну для них генетичну мозаїчність. Подібно гетерозиготним або гібридним тваринам у нащадків відбувається розщеплення, внаслідок чого порушуються цінні генетичні комбінації. Хоча химерні тварини підтримують господарськи важливі ознаки лише протягом одного покоління, у розведенні великої рогатої худоби вони можуть викликати великий практичний інтерес. Наприклад, можна створити химерних тварин, що поєднують такі ознаки, як молочна і м'ясна продуктивність, що є антагоністами і несумісні в одному організмі. Створення ін'єкційних химер шляхом введення в ембріон певних ліній клітин дозволить поліпшити імунну систему і підвищити резистентність до ряду хвороб.

Метод одержання експериментальних химер становить великий інтерес для створення ліній (клонів) тварин шляхом партеногенезу. Ембріони ссавців, що розвиваються з партеногенетично активованих яйцеклітин, як показано, гинуть. Однак, за агрегації з біологічно повноцінними ембріонами клітини ранніх партеногенетичних зародків впливають на побудову тканин химерної тварини. Якщо з партеногенетичних клонів клітин будуть формуватися гамети химерної особини, то її генотип можливо закріпити в наступному поколінні.

Одержання тварин з бажаними якостями іншим шляхом може стати пересадження химерних ембріонів, що складаються з клітин різновікових партеногенетичних і звичайних зародків. Дослідження показали, що для одержання химерних телят не обов'язково використання одновікових ембріонів. Агрегація ізольованої імунохірургічним способом внутрішньої клітинної маси 8- і 10- денних ембріонів або шляхом розрізу внутрішньої клітинної маси 14-денних ембріонів великої рогатої худоби з 5,5-денними морулами відбувалася в 89, 62 і 0% випадків, відповідно. Трансплантація 8

агрегованих ембріонів, що складаються з клітин 5,5- й 8-денних ембріонів, і 11 ембріонів, що складаються з клітин 5,5- і 10-денних ембріонів, призвела до народження шести і чотирьох телят, відповідно. У першому випадку п'ять з шести телят виявилися химерами, причому з фенотипом, здебільшого характерним для ізольованих клітин внутрішньої клітинної маси.

Використання химерних ембріонів може розширити можливості дослідників у вирішенні ряду фундаментальних проблем біології розвитку.

Контрольні питання:

1. Що таке *химера*?
2. Опишіть агрегаційний метод створення химер.
3. Опишіть ін'єкційний метод створення химер.
4. Опишіть перших міжвидових химер, що були отримані ін'єкційними і агрегаційним методом.
5. Опишіть перший метод одержання міжвидових химерних зародків між мишею і пацюком.
6. В чому важлива особливість химерних ембріонів?

Практична робота № 3 «Одержання трансгенних тварин»

План:

1. Явище трансфекції.
2. Використання ретровірусних векторів.
3. Метод мікроін'єкції ДНК.
4. Використання модифікованих ембріональних стовбурних клітин.

5. Використання сперматозоїдів як векторів трансгена.

1. Явище трансфекції

Сучасні технології дозволяють вводити рекомбінантні ДНК до клітин будь-яких типів і досліджувати наслідки експресії в них відповідних генів. Цей процес перенесення генів до клітин вищих організмів також, як і введення бактеріофагів до бактеріальних клітин, називається трансфекцією. Трансфекція еукаріотичних клітин, як правило, має два основні етапи: перенесення ДНК через клітинні мембрани у цитоплазму клітин і подальше її транспортування у ядро. На підставі біологічних наслідків, що супроводжують виникнення клітин-трансфектантів, розрізняють стабільну трансфекцію, коли рекомбінантні ДНК інтегруються в хромосоми клітин-реципієнтів і стають їх невід'ємною частиною, а також тимчасову трансфекцію (*transient transfection*), під час якої молекули рекомбінантної ДНК існують і транскрибуються у ядрах у позахромосомному стані нетривалий час.

Трансгенні технології розроблялися й удосконалювалися на лабораторних мишах. На початку 80-х років до різних ліній мишей було введено сотні генів. Ці дослідження значною мірою сприяли встановленню механізмів генної регуляції й розвитку пухлин, природи імунологічної специфічності, молекулярної генетики росту й розвитку, інших фундаментальних біологічних процесів. Трансгенні миші зіграли свою роль у дослідженні можливості великомасштабного синтезу лікарських речовин, а також у створенні трансгенних ліній, що дозволяють моделювати різні генетичні хвороби людини.

Із розвитком техніки молекулярного клонування генів число публікацій щодо отримання і дослідження трансгенних мишей стрімко зросло, поступово розширювався спектр проблем і завдань, що вирішувалися за допомогою трансгенозу. Однією з вражаючих робіт на ранніх етапах трансгенозу були експерименти Пальмітера із співробітниками у 1982 р. щодо мікроін'єкції у зиготи мишей гена гормону росту (ГТР) пацюка під контролем сильного промотора металотіонеїнового гена 1 (MT-1) миші. Перенесення такої штучної конструкції викликало посилений ріст мишей в онтогенезі і значне збільшення ваги трансформованих тварин, що народилися із ін'єкованих зигот.

На початку робіт з трансгенозу було виявлено деякі ускладнення, що пов'язані з технологією. В першу чергу процедура отримання трансгенних тварин поки ще залишається малоефективною. Трансгенні тварини часто менш життєздатні, ніж природні особини. Існують також проблеми із стабільністю експресії трансгена. Все це зумовлює ту ситуацію, що до цього часу трансгенних тварин ще мало використовують у практиці.

Уведення чужорідної ДНК можна здійснити за різними методами:

- 1) за допомогою ретровірусних векторів, що інфікують клітини ембріона на ранніх стадіях розвитку, перед імплантацією ембріона в самку-реципієнта;
- 2) мікроін'єкцією в збільшене ядро спермія (чоловічий пронуклеус) заплідненої яйцеклітини;
- 3) введенням генетично модифікованих ембріональних стовбурових клітин до предімплантованого ембріона на ранніх стадіях розвитку;
- 4) за рахунок використання сперміїв, що забезпечують інтродукцію трансгену у геном зиготи в найбільш оптимальний період; різновидом цього способу є використання в якості векторів для перенесення чужорідної чДНК в ембріональні клітини ссавців стовбурові клітини сперматогоній (СКС).

2. Використання ретровірусних векторів

Одним із методів отримання трансгенних тварин (наприклад, мишей) є зараження передімплантованих ембріонів рекомбінантними ретровірусами. Геном ретровірусів відносно невеликий і з ним досить легко маніпулювати, вводячи до нього чужорідні гени; ретровіруси достатньо інфекційні по відношенню до клітин (майже 100% зараження), а єдина копія ретровірусного генома ДНК точно визначеним чином інтегрується із ДНК клітини-мішені. Клітини, в які потрапили поряд із вірусом чужорідні гени, здатні здійснювати їх експресію. Рівень експресії клонованих генів значно підвищується внаслідок того, що ретровіруси містять досить активні транскрипційні енхансери (посилувачі). Відомі ретровірусні вектори походять від вірусів лейкозу мишей (MLV) або вірусів птиці (ALV).

Кожна вірусна часточка містить дві копії одноланцюгового РНК-генома, а після проникнення у клітину цей геном під впливом ревертази перетворюється на лінійну дволанцюгову ДНК. Для інтеграції до генома клітини-мішені дволанцюгова лінійна ДНК віруса проникає до ядра, де набуває кільцевої форми. Інтегрована лінійна ДНК-копія ретровірусного генома (провірус) містить на обох кінцях довгі нуклеотидні повтори – LTR (від англ. long terminal repeats). До складу 5'LTR входить промотор, з якого починається транскрипція генів інтегрованого провірусу; 3'LTR – сайт поліаденілювання, де здійснюється термінація РНК-транскриптів.

Існує ряд векторів на основі ретровірусного генома. У найпростіших випадках видаляють структурні гени і на їх місце вбудовують один або більше рестрикційних сайтів з метою клонування.

Для зараження рекомбінантним ретровірусом ембріональних клітин, у культуральну рідину із інфікованими фібробластами, що продукують рекомбінантний вірус, поміщають восьмиклітинну морулу, яка звільнена від

оболонки. Морула інфікується і після досягнення стадії бластоцисти її вводять у матку псевдовагітної самки. Частина бластоцист може загинути, а частина нормально розвивається і у визначений час трансформується у трансгенних нащадків, які у подальшому підлягають ретельному генетичному аналізу і можуть бути використані для створення трансгенних ліній.

Перевага методу, що заснований на використанні ретровірусних векторів, перед іншими методами трансгенезу полягає в його ефективності. Однак, розмір вставки в цьому разі обмежується 8 т.п.н., внаслідок чого трансген може виявитися позбавленим прилягаючих регуляторних послідовностей, необхідних для його експресії.

Використання ретровірусних векторів має ще один великий недолік. Хоча ці вектори створюються так, щоб вони були дефектними за реплікацією, геном штаму ретровірусу, що необхідний для одержання великої кількості векторної ДНК, може потрапити в те ж ядро, що й трансген.

3. Метод мікроін'єкції ДНК

У наш час для створення трансгенних мишей найчастіше використовують метод мікроін'єкції ДНК. Він потребує таких дій:

- Збільшення числа яйцеклітин, в які буде ін'єктована чужорідна ДНК шляхом стимуляції гіперовуляції у самок-донорів. Спочатку самкам вводять сироватку жеребної кобили (СЖК), а приблизно через 48 год. – хоріонічний гонадотропін людини. Внаслідок гіперовуляції утворюється приблизно 35 яйцеклітин замість звичайних 5...10.
- Схрещування із самцями самок з гіперовуляцією і їхнє умертвіння. Вимивання з яйцепроводів запліднених яйцеклітин.
- Мікроін'єкції ДНК у яйцеклітини, що запліднені – як правило, відразу після виділення. Часто трансгенна конструкція, що вводиться, перебуває в лінійній формі й не містить прокаріотичних векторних послідовностей.

4. Використання модифікованих ембріональних стовбурних клітин

Уперше лінія ембріональних стовбурних клітин (ЕСК) була отримана із бластоцист миші М. Евансом, М. Кауфманом і Г. Мартіном у 1981 році. Клітини, виділені з ембріонів мишей на стадії бластоцисти, можуть проліферувати (рости і розмножуватися) у культурі. Ці клітини є поліпотентними (або плуріпотентними), тобто в культурі вони можуть диференціюватися в клітини всіх трьох зародкових листків. У ЕСК не було виявлено ніяких хромосомних аберацій (мутацій) – вони зберігали нормальний генотип соматичних клітин. ЕС-клітини – це клітини-нащадки

клітин внутрішньої клітинної маси (ВКМ) бластоцисти, які отримують таким шляхом: бластоцисти культивуються на підкладці з фібробластів, осідають на дно чашки Петрі й розпластуються. Клітини ВКМ декілька разів перевіряють, і деякі з їх утворюють початок лінії ембріональних стовбурових клітин.

Перевагою одержання трансгенних тварин за допомогою ембріональних стовбурних клітин є можливість тестування інтеграції трансгену в культурі клітин. Це означає, що кожний ембріон, що розвився в культурі після пересадження ядер, буде трансгенним і наступна селекція трансгенних ембріонів не потрібна. Крім того, пересадження таких ембріонів реципієнтам приведе до народження тільки трансгенних нащадків.

Використання для одержання трансгенних тварин трансформованих ЕСК дає можливість у ряді випадків проводити оцінку експресії трансгенів, що має важливе значення. При мікроін'єкції трансгени навмання інтегруються в будь-яку частину геному. Це означає, що вони можуть руйнувати досить істотні гени (інсерційні мутації) або розміщуватися в тих частинах хромосоми, які недоступні для транскрипції. Тестування експресії в культурі уможливить використання для пересадження ядер, а отже й для одержання трансгенних тварин тільки тих клітинних ліній, у яких трансгени є транскрипційно й трансляційно активними.

5. Використання сперматозоїдів як векторів трансгена

Використання сперматозоїдів як носіїв для трансгена здатне забезпечити інтродукцію їх у геном зародка в найбільш оптимальний для цього період. Однак, це залежить від місця, в яке потрапляє чужорідна ДНК. Установлено, що для бугаїв і кнурів здатність до зв'язування трансгена обмежена головним чином екваторіальною зоною і постакросомальним районом головки сперматозоїда. Потраплення чужорідної ДНК в залишки цитоплазми в основі хвоста не призводить до трансгенозу.

Сперматозоїди мають спонтанну тенденцію до зв'язування трансгена, що присутній в культуральному середовищі. Експерименти показали, що з'єднання чужорідної ДНК і її проникнення в головку сперматозоїда можливе лише в тому разі, коли сім'яна плазма ретельно віддалена.

Використання сперматозоїдів як носіїв трансгена за запліднення *in vivo* дуже спрощує технологію отримання трансгенних тварин і може дуже збільшити частоту інтеграції чужорідних генів.

Контрольні питання:

1. Що таке *трансфекція*?

2. Перелічіть, та охарактеризуйте уведення чужорідної ДНК різними методами.
3. Переваги та недоліки застосування ретровірусних векторів.
4. Опишіть основні дії при методі мікроін'єкції ДНК.
5. Переваги одержання трансгенних тварин за допомогою ембріональних стовбурних клітин.
6. Переваги використання сперматозоїдів як векторів трансгена.

**Практична робота № 4 «Аномалії розвитку ембріонів та тварин,
отриманих методами клітинної та генної інженерії»**

План:

1. Генетичні аномалії розвитку (анеуплодія, міксоплодія, поліплодія, гаплодія).
2. Хромосомні порушення (делеція каріотипу за Y-хромосомою, транс-локації).
 1. **Генетичні аномалії розвитку (анеуплодія, міксоплодія, поліплодія, гаплодія)**

Геномні мутації – це зміна нормальної кількості хромосом в каріотипі організму певного виду. Розрізняють дві великі групи геномних мутацій: зміна плоїдності (числа наборів хромосом, що знаходяться в ядрі клітини або в ядрах клітин багатоклітинного організму) та анеуплоїдії (зміни каріотипу, при яких число хромосом у клітинах стає некратним гаплоїдному набору). У свою чергу плоїдність змінюється в напрямку її зменшення або збільшення. У першому випадку йде мова про гаплоїдії, а у другому – про поліплоїдії.

Поліплоїдією називають кратне збільшення кількості хромосом у клітині еукаріот.

Поліплоїдія набагато частіше зустрічається серед рослин, ніж серед тварин. Серед роздільностатевих тварин поліплоїдія описана у нематод, зокрема аскарид, а також у ряду представників амфібій. Так, для європейських їстівних жаб (*P.esculentus*), які є стабільним геміклонально міжвидовим гібридом жаб *P.ridibundus* і *P.lessonae*, що розмножується, типова триплоїдія ($3n = 36$).

Розрізняють автополіплоїдію і аллополіплоїдію.

Автополіплоїдія – це кратне збільшення числа наборів хромосом у клітинах організму одного і того ж біологічного виду. На основі штучної автополіплоїдизації синтезовані нові форми і сорти жита, гречки, цукрових буряків та інших рослин.

Аллополіплоїдія – кратне збільшення кількості хромосом у гібридних організмів. Виникає при міжвидовій і міжродовій гібридизації.

Окрім того в 1931 році вперше описано явище міксоплоїдії у *A.coeruleum*. Нині це широко вживаний термін, який означає наявність і співіснування в одній тканині, крім диплоїдних, клітин інших рівнів плоїдності, зокрема поліплоїдних. Для рослин міксоплоїдія швидше правило, ніж виняток.

Анеуплоїдія – зміна каріотипу, при якому число хромосом в клітинах не кратне гаплоїдному набору (n). Відсутність у хромосомному наборі диплоїдного організму однієї хромосоми називається моносомією ($2n-1$); відсутність двох гомологічних хромосом – нуллісомією ($2n-2$); наявність додаткової хромосоми називається трисомією ($2n+1$). Також зустрічається тетрасомія ($2n+2$), пентасомія ($2n+3$), гексасомія ($2n+4$), тощо.

2. Хромосомні порушення (делеція каріотипу за Y-хромосомою, транслокації)

Хромосомні аберації (хромосомні мутації, хромосомні перебудови) – тип мутацій, які змінюють структуру хромосом. Класифікують хромосомні аберації на *делеції* (втрата серединної ділянки хромосоми), *дефішенси* (втрата

кінцевої ділянки хромосоми), *інсерції* (вставки фрагментів у хромосому), *інверсії* (зміна порядку генів ділянки хромосоми на зворотній), *дуплікації* (повторення ділянки хромосоми), *транслокації* (перенесення ділянки хромосоми на іншу), *фрагментації* (дроблення хромосоми), а також утворення дицентричних і кільцевих хромосом. Відомі також ізохромосоми, які складаються з двох однакових плечей.

Якщо перебудова змінює структуру однієї хромосоми, то таку мутацію називають внутрішньохромосомною (інверсії, делеції, дефішенсі, дуплікації, кільцеві хромосоми), якщо ж двох різних, то міжхромосомною (дуплікації, транслокації, дицентричні хромосоми). Хромосомні перебудови підрозділяють також на *збалансовані* і *незбалансовані*. Збалансовані перебудови (інверсії, реципрокні транслокації) не призводять до втрати або додавання генетичного матеріалу при формуванні, тому їх носії, як правило, фенотипово нормальні. Незбалансовані перебудови (делеції і дуплікації) змінюють дозові співвідношення генів, і, як правило, їх носійство пов'язане з клінічними відхиленнями від норми.

Основною передумовою для виникнення хромосомних перебудов є пошкодження ДНК у вигляді двониткових розривів з подальшою помилкою репарації: неправильним відновленням розривів при репарації шляхом негомологічної рекомбінації або помилковим вибором паралогічної замість гомологічної послідовності ДНК при репарації під час гомологічної рекомбінації. Двониткові розриви ДНК виникають в клітині спонтанно або під дією різних мутагенних факторів: фізичних (іонізуюче випромінювання), хімічних (хіміотерапія, вплив вільних радикалів ендогенного походження на ДНК) або біологічних (транспозони, віруси). Двониткові розриви ДНК виникають запрограмовано під час профазі I мейозу, а також при дозріванні Т- і В-лімфоцитів під час специфічної соматичної V(D)J-рекомбінації (механізм соматичної рекомбінації, що відбувається на ранніх етапах диференціювання лімфоцитів і призводить до формування антиген-розпізнавальних ділянок імуноглобулінів і Т-клітинного рецептора).

Транслокація (від лат. *trans* – через і *locus* – місце, перенесення) – тип хромосомних мутацій, при яких відбувається перенесення ділянки хромосоми на негомологічну хромосому. Окремо виділяють такі різновиди транслокацій:

- нерципрокні внутрішньо- і міжхромосомні транслокації, при яких відбувається перенесення частини хромосоми в інше положення в межах даної хромосоми або на іншу хромосому відповідно;
- реципрокні транслокації, при яких відбувається взаємний обмін ділянками між хромосомами;

- робертсонівські транслокації, або центричні злиття, при яких відбувається злиття акроцентричних хромосом з повною або частковою втратою матеріалу коротких плечей.

Реципрокні транслокації є збалансованою хромосомною перебудовою; за їх формування не відбувається втрати генетичного матеріалу. Вони є однією з найпоширеніших хромосомних аномалій. Носії реципрокних транслокацій, як правило, фенотипово нормальні, при цьому мають підвищену ймовірність безпліддя, зниженої фертильності, спонтанних викиднів і народження нащадків із вродженими спадковими захворюваннями, оскільки половина гамет у них генетично незбалансована через нерівномірність розходження перебудованих хромосом в мейозі.

Робертсонівські транслокації є одним з найбільш поширених типів вроджених хромосомних аномалій у Людини. За деякими даними, їх частота становить 1:1000 новонароджених. Їх носії фенотипово нормальні, однак у них існує ризик викиднів і народження дітей з незбалансованим каріотипом, який суттєво варіює залежно від хромосом, залучених до злиття, а також від статі носія.

Контрольні питання:

1. Що таке *геномні мутації*?
2. Що таке *поліплоїдія*?
3. Що таке *автополіплоїдія* і *аллополіплоїдія*?
4. Що таке *хромосомні аберації*; дайте їх класифікацію.
5. Що є основною передумовою для виникнення хромосомних перебудов?
6. Що таке *транслокація*, та які є її види?

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. 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 / уклад. І. Х. Лумедзе., В. О. Посухін. Миколаїв : МНАУ, 2023. 78 с.
5. Капрельянц, Л. В. Теоретичні основи біотехнології : навчальний посібник. Харків : Факт, 2020. 291 с.
 6. 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.
 7. Федоренко С. Я., Науменко С. В. Технологія відтворення тварин : навчальний посібник / Харківська державна зооветеринарна академія, кафедра ветеринарної репродуктології. Харків : РВВ ХДЗВА, 2017. 204 с.
 8. Юлевич О. І., Ковтун С. І., Гиль М. І. Біотехнологія : навчальний посібник / за ред. М. І. Гиль. Миколаїв : МДАУ, 2012. 476 с.
 9. Яблонський В. А. Біотехнологічні і молекулярно-генетичні основи відтворення тварин. Львів : Афіша, 2009. 217 с.
 10. Яблонський В. А. Біотехнологія відтворення тварин. Київ : Арістей, 2005. 293 с.
 11. Яблонський В. А. Практичне акушерство, гінекологія та біотехнологія відтворення тварин з основами андрології. Київ : Мета, 2002. 317 с.

Навчальне видання

БІОТЕХНОЛОГІЯ РЕПРОДУКЦІЇ ОРГАНІЗМІВ

Методичні рекомендації

Укладачі:

Гиль Михайло Іванович

Посухін Вадим Олександрович

Формат 60 × 84/16. Ум. друк. арк. 3,0.

Тираж 15 прим. Зам. №523.

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

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