

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
МИКОЛАЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ АГРАРНИЙ
УНІВЕРСИТЕТ

В. О. Мельник, С. П. Кот, О. О. Кравченко

БІОТЕХНОЛОГІЯ
РЕПРОДУКЦІЇ ОРГАНІЗМІВ

Конспект лекцій

Миколаїв
2017

УДК 636.082. (038)
ББК 45.337
М48

Автори: В. О. Мельник, С. П. Кот, О. О. Кравченко

Друкується за рішенням науково-методичної ради Миколаївського національного аграрного університету від 27 квітня 2017 р., протокол № 8.

Рецензенти:

- І. М. Рожков – доктор біологічних наук, професор, академік АН ВШ України, завідувач кафедри біологічних основ фізичної культури та спорту МНУ ім. В.О. Сухомлинського;
О. І. Юлевич – кандидат технічних наук, доцент кафедри генетики, годівлі тварин та біотехнології МНАУ

Мельник В. О.

- Б 63 Біотехнологія репродукції організмів : конспект лекцій / В. О. Мельник, С. П. Кот, О. О. Кравченко. – Миколаїв : МНАУ, 2017. – 103 с.

У конспекті лекцій викладено сучасні матеріали біотехнології репродукції організмів та трансплантації ембріонів тварин. Розкрито суть головних біотехнологічних процесів відтворення, таких як клонування ембріонів, одержання монозиготних близнюків, створення химерних тварин.

Висвітлено новітні дослідження в біотехнології розмноження: культивування та запліднення ооцитів *in vitro*, одержання двоєн, регулювання статі плода, одержання трансгенних тварин, створення химер, клонування тварин.

Конспект лекцій призначений для здобувачів вищої освіти ступеня «бакалавр» спеціальності 162 «Біотехнологія та біоінженерія».

УДК 636.082. (038)
ББК 45.337

© Миколаївський національний аграрний університет, 2017
© Мельник В.О., Кот С.П., Кравченко О. О., 2017

ЗМІСТ

Лекція 1. Анатомія і фізіологія статевих органів самців	4
Лекція 2. Фізіологія і біохімія сперми плідників.....	10
Лекція 3. Оцінка якості сперми	17
Лекція 4. Анатомія і фізіологія статевих органів самок.....	25
Лекція 5. Фізіологічні основи трансплантації ембріонів.....	38
Лекція 6. Технологія видобування ембріонів у тварин-донорів...	46
Лекція 7. Оцінка, культивування та зберігання ембріонів.....	57
Лекція 8. Клонування ембріонів тварин.....	68
Література	102

ЛЕКЦІЯ 1

Анатомія і фізіологія статевих органів самців

План:

1. Загальна характеристика та видові особливості будови і функції статевих органів самців.
2. Сперматогенез.
3. Придаткові статеві залози та їх функція

1. Загальна характеристика та видові особливості будови і функції статевих органів самців. Для взяття сперми від плідників – першої складової процесу штучного осіменіння тварин – фахівці з відтворення тварин повинні досконало знати будову і функції статевих органів сільськогосподарських тварин.

Статеві органи самців складаються з основних статевих залоз – сім'яників (містяться в мошонці), статевих шляхів – придатків сім'яників та сім'япроводів, придаткових статевих залоз, сечостатевого каналу і статевого члена з препуцієм.

Сім'яники (*testis*) – це парні трубчасті залози яйцеподібної форми, які розміщені в сім'яниковому мішку, зовнішній шар якого називається мошонкою.

Кожний сім'яник вкритий трьома оболонками: білковою (вкриває поверхню сім'яника), спеціальною піхвою і загальною піхвою. Біля головчастого кінця сім'яника, звідки відходить головка придатка, білкова оболонка глибоко вростає у сім'яник, утворюючи середостіння сім'яника, і поділяє паренхіму його набагато часток або камер. Всередині камер знаходяться тонкі трубочки (0,1-0,2 мм) – кручені каналці сім'яника, покриті ніжною сполучною тканиною та інтерстиціальними клітинами.

У кручених каналцях утворюються спермії. Стінки каналців складаються із сполучнотканинної оболонки, сертолієвого синцитію і кількох шарів клітин – різних стадій розвитку сперміїв. Нижній шар – це наймолодші клітини (сперматогонії), які посилено діляться і перетворюються на сперматоцити першого порядку. Останні при редукційному поділі утворюють сперматоцити другого порядку, поділ яких відбувається мітотичним шляхом, причому утворюються сперматиди, що містять половину хромосом (за кількістю); із

сперматид формуються спермії у протоплазмі сертолієвого синцитію, що є живильним середовищем для статевих клітин.

У кручених канальцях сім'яників виробляються статеві гормони – андрогени (тестостерон, андростерон). Від їхньої дії залежать розвиток вторинних статевих ознак, функція органів розмноження і сексуальна поведінка тварин.

Придаток сім'яника (epididymis) тісно прилягає до самого сім'яника і складається з головки, тонкого тіла і потовщеного хвоста. У середині придатка проходить дуже покручений вузький канал завдовжки (в розправленому вигляді) від 40 до 80 м.

У каналі придатка сім'яника остаточно дозрівають спермії, вони набувають негативного заряду, що запобігає склеюванню їх, а також мають ліпопротеїдний покрив, який захищає від шкідливих впливів зовнішнього середовища. Крім того, хвостовий відділ придатка є сховищем для сперміїв, де їх нагромаджується в обох придатках 150-200 млрд. Перебуваючи у придатках, спермії зберігають запліднюючу здатність понад місяць за рахунок гальмування їхньої життєдіяльності. Тривалому зберіганню сперміїв сприяють добре постачання живильних речовин і кисню, слабкокіслова реакція середовища (рН=6,1), а також нижча температура в мошонці порівняно з температурою тіла.

Якщо плідник довго не використовувався для парування, то спермії у придатку гинуть. Отже, щоб забезпечити нормальну діяльність сім'яників плідника, треба використовувати його рівномірно і з достатнім статевим навантаженням.

Мошонка (scrotum) складається із шкіри і м'язово-еластичної оболонки, яка містить багато гладеньких м'язових волокон. Оболонка утворює вертикальну перегородку, яка поділяє мошонку на дві частини. В середині мошонки (на поверхні загальної піхвової оболонки) є м'яз – зовнішній підіймач сім'яника.

Мошонка виконує функцію терморегуляції – підтримує сталу температуру сім'яників, на 3-4°C нижчу за температуру тіла. Це відбувається за рахунок скорочення мускулатури мошонки та підіймача сім'яника. У холодний період мускулатура мошонки і підіймач сім'яника скорочуються, внаслідок чого сім'яники підтягуються ближче до черевної порожнини і при цьому водночас звужуються кровоносні судини, завдяки чому зменшується віддача тепла в зовнішнє середовище. Влітку, у спеку м'язи, навпаки, розслаблюються і мошонка з сім'яниками відвисає, збільшується її

площа, і відбувається віддача тепла в зовнішнє середовище. Окрім того, у шкірі мошонки міститься багато потових і сальних залоз, охолодженню мошонки сприяє також значне виділення поту.

Запальні процеси шкіри мошонки затрудняють процеси терморегуляції, внаслідок чого порушується сперматогенез, порушуються умови зберігання сперміїв у придатках сім'яника, спермії при цьому ушкоджуються і гинуть.

Сім'япроводи (*ductus defferens*) відходять від хвостів придатків. Це парні тонкі трубки завтовшки 4 мм, які разом із судинами і нервами утворюють сім'яні канатики (*funiculus spermaticus*), які живлять сім'яники. Стінка сім'япроводу складається з трьох шарів: слизового, м'язового і зовнішнього серозного. Внаслідок скорочення м'язового шару спермії проштовхуються у сечостатевиий канал. Над сечовим міхуром у барона, бугая і жеребця є веретеноподібні потовщення – ампули сім'япроводів, які під час статевого збудження заповнюються сперміями, завдяки чому сперма виділяється дуже швидко одним імпульсом.

Сечостатевиий канал (*urethra masculini*) має вигляд трубки і складається з трьох оболонок – слизової, у якій містяться численні уретральні залози; середньої судинної оболонки – сітки з розширеними кровоносними судинами, що утворюють печеристі тіла (каверни). Останні при статевому збудженні наповнюються кров'ю, внаслідок чого печеристі тіла набрякають, просвіт сечостатевого каналу розширюється, що полегшує виділення сперми. Зовнішня оболонка сечостатевого каналу утворена сечостатевиим і цибулинно-печеристим м'язами, скорочення яких сприяє проштовхуванню сперми або виведенню сечі.

Статевиий член (*penis*) – орган парування. Він знаходиться в шкіряному мішку – препуції (*preputium*), коли тварина перебуває у стані спокою. При статевому збудженні він збільшується у розмірах, стає твердим (ерекція) і висовується з препуцію.

Статевиий член складається з головки тіла і кореня. Головку утворює одне венозне, а основу тіла – два артеріальних печеристих тіла. Венозне печеристе тіло головки добре розвинене у жеребця і слабко у бугая, барана і кнура.

На нижньому боці статевого члена є жолобок, по якому проходить сечостатевиий канал. Внутрішній кінець статевого члена – корінь прикріплений двома ніжками до сідничних кісток, де розміщений сильний сіднично-печеристий м'яз, який стискає ніжки і

перешкоджає відтіканню венозної крові під час ерекції. У бугая, барана і кнура статевий член (у середній частині) утворює S-подібний згин, який випрямляється під час ерекції. Після садки статевий член втягується назад у препуцій спеціальним ретрактором. Загальна довжина статевого члена у різних тварин під час ерекції становить, см: у бугая – 100-150, барана – 40-50, кнура – 50-80. У жеребця пеніс розвинений більше в товщину.

Кровообіг органів розмноження плідників здійснюється сім'яними і сиромітними артеріями, а іннервація – спеціальними гілками симпатичної і парасимпатичної системи.

2. Сперматогенез. Утворення сперміїв відбувається в звивистих сім'яних каналцях. Стінка звивистих каналців складається з двох родів клітин: сперміогенних (що дають спермії) і живлять (клітини Сертолі). Сперміогенні клітини мають округлу форму і розташовані в кілька рядів. Клітини Сертолі мають ядра трикутної форми, а їх цитоплазма витягнута у вигляді мов полум'я і простягається до просвіту ізвитого сім'яного каналця. Сперміогенез протікає в 4 стадії: розмноження, росту, дозрівання і формування. Наймолодші клітини сперматогенного епітелію знаходяться на базальній мембрані звивистих каналців і називаються сперматогоніями. Вони відрізняються малими розмірами і овальним ядром. У процесі розподілу половина сперматогоній А типу переходить в проміжний тип, а інші утворюють резерв для наступного сперматогенного циклу. Кожен сперматогоній проміжного типу в результаті чотирьох послідовних поділів дає 16 сперматогоній Б типу; останні перетворюються в сперматоцити 2-го порядку, що містять гаплоїдний (половинний) набір хромосом.

З кожного сперматоцита 2-го порядку утворюється дві сперматиди. Сперматиди – це невелика клітина округлої форми. Формування сперміїв з сперматид відбувається в цитоплазматичних виростах клітин Сертолі. У кожній клітині Сертолі одночасно поміщається до 8-12 сперматид. Шляхом складних перетворень з сперматид утворюються спермії. Цей процес протікає в такий спосіб. Ядро сперматиди зсувається до одного з полюсів, ущільнюється і утворює головку. Апарат Гольджі формує на передній частині головки акросому. Цитоплазма витягується в протилежному напрямку. При цьому з центросоми утворюються дві центріолі (проксимальна і дистальна) і осьові елементи спермія, а з мітохондрій – спіральні елементи. Залишки цитоплазми сповзають в процесі

дозрівання спермія. Після завершення формування спермії за допомогою ферменту гіалуронідази розчиняють цитоплазматичний виріст, відторгаються і надходять у просвіт звивистих каналців, а потім в прямій каналець, сітку сім'яника і через сперміовинощі каналці – в канал придатка сім'яника. За звичайних умов годівлі та утримання в сім'яниках бугая і барана за добу утворюється 5-7 млрд, кнура і жеребця – 15-20 млрд сперміїв. Сформовані спермії просуваються по каналцям системи завдяки тиску маси і секрету, скорочень м'язів, коливанням війок миготливого епітелія. Просуванню їх по голівці і тілу придатка сім'яника сприяє власна рухливість сперміїв, обумовлена слабощелочною реакцією середовища.

По каналу придатка сім'яника спермії проходять дозрівання. Сутність цього процесу полягає в тому, що спермії обволікаються в'язким секретом епітеліальних клітин, в результаті на їх поверхні утворюється тонка захисна плівка – ліпопротеїдний покрив, а цитоплазматична крапля зникає. З ліпопротеїдним покровом також пов'язане придбання негативного електричного заряду. Це має велике значення, так як перешкоджає зіткненню і склеюванню сперміїв.

Тривалість сперміогенного циклу у бугая становить 54 дні, барана – 49, кнура – 34 дні. Для проходження каналу придатка сім'яника потрібно один тиждень. Зрілі спермії накопичуються в розширеній (хвостовій) частині каналу придатка сім'яника. Тут зосереджується величезна їх кількість: у бугая і барана - 150-200 млрд, кнура і жеребця - 200-300 млрд.

Нейрогуморальна регуляція статевої функції самців. Зовнішні подразники (вплив інсоляції, корми, самки) передаються в кору головного мозку, де сприймаються і аналізуються спеціальними центрами. Рілізінг гормон, що виділяється гіпоталамусом, направляється в передню частку гіпофіза. Останній виділяє ФСГ (фолікулостимулюючий гормон) і ЛГ (лютеїнізуючий гормон). ФСГ обумовлює прояв сперміогенеза, а ЛГ стимулює розвиток інтерстиціальних клітин в сім'яника. У сім'яниках клітини Лейдіга виробляють гормон тестостерон. На даній стадії у самця добре проявляються ознаки статевої активності, особливо в присутності самки. До цього часу задня частка гіпофіза виділяє оксітоцин, що активізує функцію придатка сім'яника, що проявляється просуванням частини сперміїв в ампули сім'япроводів. Надлишок тестостерону в крові підвищує через ЦНС статеве збудження самця, діяльність

міхурцеподібних, цибулинних залоз і передміхурової залози. На тлі статевого збудження самець стає рухомим, у нього збільшується частота дихання і серцевих скорочень. Внаслідок активізації центру ерекції в області крижів розслабляється ретрактор пеніса. Статевий член, швидко наповнюючись кров'ю, збільшується, стає пружним, з його каналу виділяється у вигляді крапель світла рідина – суміш секретів придаткових залоз (уретральних, цибулинних).

Статевий акт починається з обнімательного рефлексу, за яким слід парувальний рефлекс. Відбувається збудження розташованого в області попереку центру еякуляції, чим закінчується коїтус. Через 5-30 с після цього у самця згасають ерекція, загальне і статеве збудження, нормалізується серцебиття і дихання.

3. Придаткові статеві залози та їх функція. Придаткові статеві залози та їхні вивідні протоки відкриваються у багато функцій.

Передміхурова залоза (gl. prostate) розміщена біля шийки сечового міхура. Вона добре розвинена у жеребця, кнура і бугая, крім великого тіла, розвинена також розсіяна частина, а в барана — тільки розсіяна частина.

Міхурцеподібні залози (gl. vesicularis) парні, розміщені над шийкою сечового міхура. Мають порівняно великі розміри у бугая, жеребця і кнура.

Цибулинні (куперові) залози (gl. bulbourethralis) знаходяться в кінці тазової частини сечостатевого каналу. Вони добре розвинені в кнура і жеребця.

Уретральні залози (gll. urethrales) розміщені у слизовій оболонці сечостатевого каналу. їх рідкий секрет промиває канал від залишків сечі.

Секрети придаткових статевих залоз виконують такі функції: промивають сечостатевий канал перед виділенням сперми; збільшують об'єм еякуляту; активізують рух спермій; розріджують сперму, що полегшує її просуванню по сечостатевому каналу; проштовхують густу масу сперми в глибину рогів матки та закупорюють просвіт каналу.

ЛЕКЦІЯ 2

Фізіологія і біохімія сперми плідників

План:

1. Загальні відомості про сперму і її хімічний склад
2. Хімічний склад сперміїв, будова сперміїв, швидкість і види їх руху
3. Енергетичні процеси у сперміях
4. Дія на спермії умов навколишнього середовища

1. Загальні відомості про сперму і її хімічний склад.

Сперма (сім'я) – продукт життєдіяльності головних статевих залоз сім'яників, їхніх придатків і придаткових статевих залоз. Вона складається з чоловічих статевих клітин – сперміїв (їх називають ще сперматозоонами, чоловічими гаметами, сперматозоїдами, сперміями, живчиками) і рідкої частини – плазми (секрет придатка сім'яника, передміхурової, міхурцеподібних і цибулинних залоз).

Співвідношення між об'ємом сперміїв і плазмою в основних видів сільськогосподарських тварин різне. Секреторна активність придаткових залоз у кнура і жеребця досить висока (секретів у спермі багато), тому сперма цих плідників відносно слабконасичена сперміями. Бугай і баран виділяють відносно густу сперму. В еякуляті барана спермії становлять до 30% всього об'єму сперми, бугая – до 14, кнура – до 7, жеребця – близько 3%. Плазма сперми – це прозора рідина, яка виробляється судинною і лімфатичними тканинами.

Розвиток придаткових залоз, кількість та хімічний склад секрету в еякуляті у тварин різних видів значно відрізняються. На співвідношення компонентів сперми одного і того самого виду тварин впливають умови утримання, годівлі, пора року. Від 85 до 98 % маси сперми становить вода, інші 2-15% – суха речовина. Сперма всіх видів тварин багата на білки – від 49 до 83% сухої речовини. Так, лише плазма бугая містить понад 5% різних білків. У спермі барана і бугая міститься багато цукру – фруктози (до 700-900 мкг/%), незначна кількість глюкози, лактози, арабінози тощо; в спермі кнурів і жеребців фруктоза міститься лише у невеликій кількості. Сперма бугаїв і баранів відносно багата на ліпіди, у кнурів і жеребців вміст їх значно нижчий. Проте сперма кнура має високий вміст солей калію,

натрію, кальцію та ін. У спермі бугаїв і баранів переважають цитрати калію і натрію, кнура – хлориди, цитрати і карбонати. Цитрати і дигідрокарбонати виконують роль природної буферної системи. Від вмісту цих солей у спермі значною мірою залежить осмотичний тиск її. Рідка частина сперми кнура і жеребця відносно багата на хлориди. У спермі тварин виявлено також різні ферменти.

2. Хімічний склад сперміїв, будова сперміїв, швидкість і види їх руху. Спермії утворюються при сперматогенезі з клітин зародкового епітелію кручених каналців сім'яника. Встановлено, що тривалість сперматогенезу в бугаїв 62-63 доби, баранів – 47-48, кнурів – 39-40 діб. Тривалість сперматогенезу генетично зумовлена і незмінна. Спермії складається з головки, шийки, тіла і хвостика. Загальна довжина його 58-70, а ширина – 1-5 мкм. Об'єм спермія дуже малий і становить 60-125 мкм³. Об'єм спермія приблизно у 10-20 тис. разів менший за об'єм яйцеклітини.

Маса головки становить 51% загальної маси спермія. Вона має форму овальної пластинки, опуклої з одного боку і ввігнутої з іншого, яка поступово звужується спереду назад. Головка містить ядро, акросому й цитоплазму. Акросома покриває (у вигляді ковпачка) передні 2/3 частини ядра. Вона містить набір гідролітичних ферментів. Необхідних для запліднення яйцеклітини і початку розвитку ембріонів. Акросома порівняно з іншими структурами спермія найбільше насичена водою, що є однією з причин її високої чутливості до охолодження і заморожування.

Більшу частину головки спермія займає ядро. У ньому знаходиться хроматин (нуклеопротейд) – сполука дезоксирибонуклеїнової кислоти (ДНК) з простим білком гістоном. У ДНК закодована спадкова інформація організму.

Шийка, тіло і хвіст спермія – єдина частина моторної системи клітини. Шийка – найкрихітліша частина спермія. Це власне кінетичний центр його активності. Всередині від шийки до кінця хвоста спермія проходить осьова нитка, яка оточена подвійною (місцями потрійною) спіральною ниткою. Всередині осової нитки містяться дві центральні фібрили, від яких на малій відстані розміщені два кільця бокових фібрил. Кожне кільце складається з 9 фібрил (ті, що знаходяться ближче до центральних фібрил, називаються «тонкими», а зовнішні – «грубими»). Тобто це складна система фібрил, розташованих концентричними колами навколо центральної пари фібрил. Фібрилярна формула джгута 9+9+2

фібрили. По всій довжині тіла спермія фібрили щільно з'єднані спіральними нитками, але в хвості їх немає. Відсутні також зовнішні («грубі») фібрили. Спіральна нитка складається з великої кількості мітохондрій, які забезпечують окислювально-відновні процеси у сперміях.

По всій довжині, за винятком кінцевої частини хвоста, поверхня спермія покрита плазматичною мембраною ліпопротеїдної природи, яка має мозаїчну структуру. Мембрана регулює електролітичний градієнт між сперміями та середовищем, захищає їх від шкідливої дії зовнішніх умов, транспортує поживні речовини, виконує специфічні для сперміїв функції, пов'язані із заплідненням.

За хімічним складом спермії значно відрізняються від сперми. Вони містять близько 75% води і 25% сухої речовини, 85% якої становлять білки, 13,2% ліпіди, 1,8% мінеральні речовини. У складі білків сперміїв найбільше міститься аргініну (до 20% сухої речовини сперміїв), лізину, цистину і глутамінової кислоти.

Як уже зазначалося, головка спермія складається переважно із складного білка – нуклеопроїду, а тіло і хвіст – з білків і ліпідів. Особливо багато ліпідів у хвості сперміїв (близько половини цієї кількості становлять ліпіди плазмалоген і лецитин, що містять фосфор). Шийка, тіло і хвіст спермія відрізняються від головки кількістю ферментів. Усі головні ферменти зосереджені у хвостовій частині спермія, в меншій кількості – у шийці й тілі і в ще меншій – у головці.

Характерна властивість сперміїв – швидкий рух у навколишньому середовищі. Органами руху в них є тіло і хвіст. Тіло – опора для хвоста і під час руху залишається прямим. Ритмічними і частими скороченнями хвоста то в один, то в інший бік спермії відштовхується і рухається вперед. Скорочення перебігають по хвосту одне за одним, внаслідок чого він змієподібно вигинається. Плоскоовальна (неправильної форми), трохи опукла з одного боку головка забезпечує обертання спермія навколо поздовжньої осі, і він гвинтоподібно просувається вперед. Обертання спермія відбувається також за рахунок спіральної покресленості поверхні тіла. Швидкість руху спермія залежить від температури, складу середовища і становить в середньому 5 мм/хв при +5°C і 10 мм/хв при +38°C.

Розрізняють три види руху сперміїв: прямолінійно-поступальний, маневрний та коливальний. Для прямолінійно-поступального руху характерне пересування спермія вперед по

прямій лінії (це характерно для нормальних сперміїв та сперми високої якості). Внаслідок тривалого зберігання сперміїв, а також під дією шкідливих факторів середовища головка спермія набрякає, змінюється її форма. При цьому спермії послаблюються і починають рухатися по замкнутому колу (маневний рух) і в ще більш ослаблених сперміях вони тільки коливаються на одному місці (коливальний рух).

Сперміям властивий реотаксис – здатність рухатися проти течії рідини та тигмотаксис — здатність занурюватися і проникати в зустрічні клітини. Для виявлення реотаксису необхідно, щоб джерелом енергії для підтримання життєдіяльності сперміїв і збереження здатності їх до руху є: дихання, фруктоліз і розщеплення аденозинтрифосфату, який сприяє передаванню набутої внаслідок дихання або фруктолізу енергії на руховий апарат спермія.

3. Енергетичні процеси у сперміях. Процес дихання відбувається за рахунок окислення вуглеводів, ліпідів (особливо їхніх фосфатидів) і білків. Насамперед окислюються моносахариди – фруктоза і глюкоза, а потім – молочна кислота, що утворюється при розщепленні цих сполук. Достатня кількість цукрів у спермі запобігає витрачанням таких важливих речовин, як білки і ліпіди, на дихання сперміїв. Останні є структурними елементами клітини. При розщепленні вуглеводів утворюються вуглекислий газ, вода і виділяється багато енергії. В разі нестачі цукрів при диханні витрачаються фосфати – плазмалоген і лецитин. У спермі жеребця на дихання витрачається певна кількість білків, про що свідчить нагромадження аміаку під час зберігання її.

Дихання – основний енергетичний процес, від якого спермії дістають 90% необхідної енергії. Воно посилюється при підвищенні температури і послаблюється при її зниженні, причому на кожні 10°C дихання посилюється (або послаблюється) вдвічі. Лужне середовище підвищує інтенсивність дихання, кисле – навпаки знижує. Іншим енергетичним процесом, при якому спермії одержують енергію, є розщеплення цукру без участі кисню – фруктоліз або гліколіз. При цьому процесі виділяється у двадцять разів менше енергії на 1 моль фруктози, ніж при диханні. Гліколіз – другорядне джерело енергії порівняно з диханням і менш економічний процес, але коли немає кисню, він стає єдиним.

Внаслідок фруктолізу утворюється молочна кислота, яку спермії виділяють крізь свою мембрану в навколишнє середовище.

Молочна кислота гальмує біохімічні процеси у сперміях, внаслідок чого вони впадають у стан анабіозу, тобто втрачають рухливість, залишаючись живими. Анабіотичний стан — позитивний фактор, оскільки він збільшує строки зберігання сперміїв. Накопичення значної кількості молочної кислоти у сперміях призводить до ушкодження і загибелі їх.

Наявність або відсутність фруктолізу, хімічний склад сперми, а також неоднакове співвідношення у ній сперміїв і її рідкої частини дають можливість розрізняти два типи сперми. До першого типу належить сперма бугая і барана (плідники виділяють густу сперму, що містить цукор, з високим рівнем фруктолізу), до другого – сперма кнура і жеребця (сперма цих тварин рідка, в ній дуже мало цукрів і фруктоліз майже не відбувається). Проте спермії кнура і жеребця здатні до фруктолізу при розбавлянні сперми розріджувачами, до складу яких входить цукор.

Останнім енергетичним процесом, що відбувається в сперміях, є розщеплення аденозинтрифосфату, який є переносником енергії, що виділилася при диханні або фруктолізі до скоротливого білка спермія – спермозину, який зумовлює скорочення і рух хвоста спермія.

Знання процесів обміну речовин у сперміях потрібне для організації успішного використання і зберігання сперми поза організмом. Розробляючи способи зберігання сперми, слід зважати на те, як відбуваються складні біохімічні процеси при дії на спермії багатьох фізико-хімічних факторів.

Зовнішнім середовищем для сперміїв є насамперед рідка фаза сперми – плазма. Зміни, що відбуваються у плазмі, позначаються на властивостях і життєдіяльності сперміїв. Із багатьох фізико-хімічних факторів значно впливають на спермії осмотичний тиск, іонний склад та реакція середовища, буферність, температура, дія світла і дезинфікуючих речовин тощо.

Осмотичний тиск зумовлюється кількістю молекул або іонів, розчинених речовин в одиниці об'єму сперми, тобто цей показник прямо пропорційний кількості розчинених солей і цукрів у плазмі і протоплазмі сперміїв. На практиці величину осмотичного тиску визначають за точкою замерзання розчину. Вода як розчинник замерзає при 0°C, а водні розчини – при температурі нижче за 0°C, причому зниження точки замерзання (виражають терміном «депресія») пропорційне кількості розчинених у воді часточок.

Сперма сільськогосподарських тварин замерзає при температурі 0,57-0,64°C, і це значення відповідає величині осмотичного тиску 780-820 кПа. Для нормальної життєдіяльності сперміїв необхідно, щоб осмотичний тиск зовнішнього середовища, у якому знаходяться клітини, відповідав осмотичному тиску всередині сперміїв. Розчини, осмотичний тиск яких дорівнює тиску у сперміях, називаються ізотонічними (ізоосмолярними). Розчини з підвищеним осмотичним тиском називаються гіпертонічними (гіперосмолярними) а із зниженим – гіпотонічними (гіпоосмолярними). У цих розчинах спермії ушкоджуються або гинуть, причому гинуть тим швидше, чим більше відхилення від ізотонії. Це пояснюється тим, що мембрана спермія за своїми фізико-хімічними властивостями є напівпроникною, тобто крізь неї вільно проходить в обох напрямках вода, а часточки речовин проникають із значно меншою швидкістю, а деякі з них зовсім не проникають. Тому в гіпотонічних розчинах спермії набрякають за рахунок води, яка швидко проникає всередину клітин, і вони гинуть. Переміщення води у різні боки на межі клітина – середовище відбувається завдяки дифузії та осмосу. В гіпертонічних розчинах, навпаки, вода швидко виходить із спермія, протоплазма його зневоднюється і він зморщується. Як в гіпо-, так і в гіпертонічних розчинах спермії гинуть внаслідок ушкодження тонких субмолекулярних структур клітини.

Іонний склад середовища відіграє важливу роль у життєдіяльності сперміїв. Наявність у спермі великої кількості солей несприятливо позначається на виживаності сперміїв. Катіони солей нейтралізують негативний електричний заряд сперміїв, внаслідок чого відбувається аглютинація клітин (тобто склеювання їх між собою), які втратили заряд. Аглютинація відбувається також в кислому середовищі, що містить велику кількість катіонів водню, і при наявності багатовалентних катіонів кальцію, магнію, алюмінію та інших, які мають подвійний і потрійний електричні заряди. Щоб такі катіони не потрапляли у сперму, при її розбавлянні і зберіганні застосовують скляний або полімерний посуд.

Деякі аніони, наприклад аніон хлору, діють несприятливо на виживаність сперміїв, а наявність таких аніонів, як фосфатний, цитратний, сульфатний, тартратний, підвищують строки виживання їх. Тому солі, що містять ці аніони, а також солі одновалентних елементів часто вводять до складу розріджувачів сперми.

Свіжа сперма бугая і барана має слабкокисло (рН= 7,7-6,9) реакцію, близьку до нейтральної (рН=7,0), сперма кнура і жеребця – слабколужну (рН=7,2-7,6). Зміщення реакції середовища у свіжій спермі до рН=6,5-6,8 свідчить про високу життєздатність сперміїв.

Для сперми властива буферність, тобто здатність підтримувати реакцію середовища на постійному рівні. Буферні властивості сперми зумовлюються наявністю в ній солей слабких кислот (вугільної, лимонної, молочної, фосфорної) та білків.

4. Дія на спермії умов навколишнього середовища.

Температура — один з найважливіших факторів життєдіяльності сперміїв. Від неї залежать обмінні процеси в клітинах. Як правило, ці процеси прискорюються при підвищенні температури до певного значення і сповільнюються при її зниженні. Оптимальною температурою для життя і збереження сперміїв є температура тіла тварин. Проте зберігання сперми поза організмом при цій температурі призводить до нагромадження шкідливих продуктів, наприклад, молочної кислоти, до метаболізму сперміїв, і вони швидко втрачають поживні речовини й гинуть. Зниження температури зберігання сперми гальмує обмін речовин та рух сперміїв і тим самим продовжує їхню живучість. З практики штучного осіменіння відомо, що спермії тварин можуть без шкоди для себе переносити зниження температури до 0°C, а при спеціальній обробці сперми – і до температур, близьких до абсолютного нуля (-273°C), відновлюючи після нагрівання свою рухливість і зберігаючи запліднювальну здатність. Однак при швидкому охолодженні спермії гинуть або ушкоджуються. Таке явище називається холодовим ударом (температурним шоком) сперміїв. Особливо чутливі до швидкого охолодження спермії, щойно виділені самцем. Сильне ушкодження їх відбувається при швидкому перепаді температури нижче 18°C. Так, при швидкому охолодженні сперми від 38 до 0°C гинуть майже всі спермії. Тому на племпідприємствах і пунктах штучного осіменіння температура приміщення, де проводиться робота із спермою, не повинна бути нижче 18°C.

Незважаючи на те що холодовий удар завдає великої шкоди сперміям, його можна усунути спеціальною обробкою, рівномірно і сповільнено охолоджуючи і розбавляючи сперму середовищами, що містять жовток курячого яйця та гліцерин.

Дія світла – важливий фактор впливу на виживаність сперміїв. Розсіяне (денне) світло, світло електричних і газових ламп при

короткочасній дії не впливає на життєдіяльність сперміїв. Проте зберігати сперму потрібно тільки в темряві. Пряме сонячне проміння, а також проміння бактерицидних ламп ушкоджує спермії або призводить їх до загибелі. Тому на станціях і пунктах штучного осіменіння сперму оберігають від попадання сонячних променів, завішуючи вікна марлевими занавісками (бажано, щоб вікна виходили на північ).

Отже, вплив різних факторів зовнішнього середовища на життєдіяльність сперміїв свідчить про те, наскільки чутливі до них клітини. Незначні відхилення і порушення правил інструкції взяття, розбавлення і зберігання сперми, а також введення її самкам, призводять до грубих помилок у роботі, а, отже, до збільшення яловості маточного поголів'я і зменшення плодючості самок.

ЛЕКЦІЯ 3

Оцінка якості сперми

План:

1. Оцінка сперми за зовнішніми ознаками (загально-санітарна оцінка)
2. Окомірна оцінка сперми під мікроскопом за густотою і активністю (рухливістю) сперміїв
3. Визначення концентрації сперміїв
4. Оцінка сперми за знебарвленням метиленового синього
5. Визначення відсотка живих сперміїв способом зажиттєвого забарвлення

1. Оцінка сперми за зовнішніми ознаками (загально-санітарна оцінка). Оцінка якості сперми – важлива складова в організації роботи плімпідприємств і пунктів штучного осіменіння. Між якістю сперми і загіліднюваністю самок існує прямий зв'язок. Звичайно, остаточно визначити якість сперми можна тільки після того, як самки дадуть приплід або прийдуть у повторну охоту. Проте ще до осіменіння можна скласти уявлення про придатність сперми, визначаючи ті чи інші її властивості. Показники спермопродуктивності плідника умовно поділяють на кількісні та якісні.

Найпершу оцінку сперми встановлюють одразу після взяття еякуляту. Спочатку визначають його об'єм і досліджують колір, запах та консистенцію. Ця оцінка називається загальною санітарною, макроскопічною, або органолептичною.

Консистенція і колір сперми характерні для кожного виду тварин: у барана – сметаноподібна, біла з жовтуватим відтінком, у бугая – подібна до молока, біла, у жеребця і кнура – водяниста, сірувато-біла. Крім того, у кожного виду тварин сперма має слабкий специфічний запах. Не можна використовувати сперму рожевого, зеленого чи синюватого кольору з наявністю пластівців, згустків або з неприємним запахом. Відхилення від норми виникають при запальному процесі у придаткових статевих залозах. Тому при взятті такої сперми треба провести клінічне та лабораторне дослідження плідника, щоб визначити стан його статевих органів.

Об'єм еякуляту бугая і барана визначають за допомогою градуйованих сгіермоприймачів, піпеток чи пробірок, а еякуляту жеребця і кнура – за допомогою мензурки або циліндра після фільтрування. В одноразовому поліетиленовому спермоприймачі об'єм еякуляту визначають зважуванням на терезах (1 г сперми відповідає 1 мл).

2. Окомірна оцінка сперми під мікроскопом за густиною і активністю (рухливістю) сперміїв. Окомірно сперму оцінюють під мікроскопом. Це найпростіший спосіб оцінки її якості. Таку оцінку обов'язково здійснюють на всіх без винятку плімідприємствах і пунктах штучного осіменіння. Щоб правильно визначити якість сперми, потрібно правильно приготувати препарат сперми, створити відповідну температуру, виконавець повинен мати достатню кваліфікацію.

На чисте сухе предметне скло, підігріте до 38-40° С, наносять стерильною скляною паличкою або піпеткою краплю сперми середніх розмірів і накривають чистим накривним склом. Сперма рівномірно заповнює весь простір під накривним склом, але не витікає за його краї. У ній не повинно бути вільного простору і бульбашок повітря. Такий препарат сперми дістав назву нормальної роздавленої краплі. Температура в приміщенні, де приготують препарат сперми, не повинна бути нижче 18-20°С, оскільки свіжовзята сперма дуже чутлива до змін температури. Для оцінки активності (рухливості) сперміїв користуються фанерним

термостатом з температурою 38-40° С або спеціальним електричним нагрівальним сто диком з автоматичним регулюванням температури.

Приготовлений препарат сперми кладуть на предметний столик мікроскопа поміщений у термостат (нагрівальний столик), регулюють освітленість поля зору діафрагмою і дзеркалом мікроскопа, наводять різкість зображення поля зору мікроскопа і визначають густоту сперми та активність сперміїв. Визначення проводять в одній і тій самій краплі і в кількох полях зору мікроскопа.

Густоту сперми (ступінь насиченості її сперміями) визначають, використовуючи для цього тільки порозбавлену (нативну) сперму. За густотою сперму поділяють на чотири категорії і позначають відповідними літерами.

Густа сперма (Г) – все поле зору суцільно заповнене сперміями, між якими практично не видно проміжків. В 1 мл густої сперми міститься понад 1 млрд сперміїв.

Середня сперма (С) – характеризується наявністю проміжків між сперміями, але розміри їхні менші за довжину самого спермія. В 1 мл сперми міститься від 200 млн до 1 млрд сперміїв Рідка сперма (Р) – проміжки більші за довжину спермія. Це відповідає концентрації сперміїв, меншій за 200 млн/мл.

Аспермія (А) або олігоспермія (О) – у спермі немає сперміїв або є незначна кількість.

При дослідженні активності сперміїв окомірно визначають процентне співвідношення їх з нормальним прямолінійним рухом до загальної кількості у полі зору мікроскопа. Під загальною кількістю розуміють кількість сперміїв з прямолінійним, манежним (М) та коливальним (К) рухом, а також нерухливі (Н) спермії. Спермії з манежним і коливальним рухом та нерухливі умовно вважають мертвими (бракованими). Проте коливальні рухи і нерухливість можуть спостерігатись і в нормальних сперміях при низькій температурі, порушенні оптимальних умов зберігання сперми, пониженій кислотності середовища. Такі спермії відновлюють прямолінійний поступальний рух при підігріванні або нейтралізації кислого середовища розчином цитрату натрію.

Активність сперміїв оцінюють за 10-бальною шкалою, один бал якої дорівнює 10 % сперміїв з прямолінійним поступальним рухом. Якщо під час дослідження під мікроскопом практично всі спермії рухаються поступально, то сперма оцінюється в 10 балів (найвища оцінка). Ознакою для цієї оцінки є бурхливий вихороподібний рух

сперміїв. При трохи сповільненому вихороподібному русі оцінка становить 9-8 балів і т. д.

У журналі обліку якості взятої сперми' записують оцінку густоти та активності кожного еякуляту плідника окремо, позначаючи літерами густоту, а цифрами – активність. Так, оцінка Г-9 означає, що сперма густа, в ній 90% сперміїв, рухаються вони прямолінійно поступально; Р-7 – сперма рідка, з 70сперміїв, які рухаються поступально. Розбавлену сперму оцінюють тільки за активністю сперміїв і в журналі записують лише цифри.

Для використання придатна свіжовзята сперма, наприклад барана з оцінкою не нижче Г-8, бугая – не нижче С-8, кнура – Р-7, жеребця – не нижче Р-5 Після окомірної оцінки, якщо сперма відповідає мінімально допустимим показникам густоти та активності сперміїв, відразу визначають їхню концентрацію. Концентрація сперміїв означає кількість їх у 1 мл сперми і виражається В мільйонах або мільярдах штук її визначають за допомогою лічильних камер і експрес-методами.

3. Визначення концентрації сперміїв. Підрахунок сперміїв у лічильній камері. Лічильну камеру застосовують для визначення кількості формених елементів крові Для цього використовують камери Горяєва, Тома-Цейса, Бюркера, Ключарева-Предтеченського. Крім того, для визначення концентрації сперміїв використовують змішувачі (меланжери) еритроцитний (з червоною кулькою) – для сперми бугая і барана та лейкоцитний (з білою кулькою) – для сперми кнура і жеребця. Лічильна камера Горяєва – це товстостінна довгаста скляна пластинка, посередині якої є три площинки, відмежовані одна від одної жолобками (канавками). Дві крайні площинки називаються опорними, а середня, яка розділена також жолобком на дві половинки, називається площинкою камери. Вона на 0,1 мм нижча за крайні (це позначення є на камері). На кожній з половинок камери вигравірована сітка, яка має площу 9 мм² і складається з 225 великих квадратів по 15 квадратів у рядку. З цих великих квадратів 25 у кожному ряду розграфлені на 16 малих квадратів. Кількість сперміїв підраховують у 5 великих (80 маленьких) квадратах по діагоналі. Перед визначенням концентрації сперміїв до опорних пластинок чистої і знежиреної лічильної камери притирають шліфоване скло (подібне до накривного) до появи у місцях стикання стекол райдужних (ньютонівих) кілець. Між середньою площинкою і накривним склом утворюється щілиноподібний простір, який

наповнюється спермою.

Після підготовки до роботи лічильної камери у змішувач набирають досліджувану сперму і 3% розчин хлориду натрію. Змішувачі повинні бути чистими, для цього їх після кожного підрахунку послідовно промивають водою, спиртом, ефіром і просушують, продуваючи крізь змішувач повітря гумовою грушею. Якщо змішувач підготовлено до роботи правильно, то скляна намистина всередині пухирця (розширення) змішувача до стінок не прилипає. У меланжер за допомогою гумової трубки, з'єднаної з верхнім кінцем змішувача, набирають спочатку (насмоктування) сперму до позначки 0,5 або 1, потім 3 % розчин хлориду натрію до верхньої позначки (вище пухирця). Сперму барана набирають в еритроцитний змішувач до позначки 0,5, а сперму бугая – до позначки 1; сперму кнура і жеребця – у лейкоцитний змішувач до позначки 0,5. Потім кінчик змішувача швидко витирають ватою, набирають 3 % розчин хлориду натрію в еритроцитний змішувач до позначки 101, а в лейкоцитний – до позначки 11 і розбавляють таким чином сперму барана у 200, бугая – у 100, кнура і жеребця у 20 разів. Сперму розбавляють тому, що живі спермії в густій спермі підрахувати неможливо. Набрану сперму і розчин, попередньо заткнувши обидва кінці змішувача великим і вказівним пальцями, струшують 1-2 хв, рівномірно перемішуючи з розчином. Потім з капіляра змішувача випускають перші 4-5 крапель, а п'яту або шосту обережно впускають під притерте до камери накривне скло.

Підготовлену камеру кладуть на предметний столик мікроскопа, регулюють освітленість поля зору і починають підрахунок сперміїв при збільшенні в 300-400 разів. Спермії підраховують у п'яти великих квадратах по діагоналі. Підраховують тільки головки сперміїв, які знаходяться посередині квадрата або лежать на лівій і верхній його лініях. Спермії, що лежать на правій і нижній лініях, підраховують у суміжних квадратах. Концентрацію сперміїв можна визначити за спрощеною формулою, якщо глибина камери становить 0,1 мм. Так, якщо сперму набирали до позначки 1, то кількість підрахованих сперміїв ділять на 200, а коли сперму набирали до позначки 0,5, то ділять на 100. Одержана цифра – це концентрація сперміїв у мільярдах в одному мілілітрі.

Метод визначення концентрації сперміїв за допомогою лічильної камери найточніший. Проте у виробничих умовах ним користуються не завжди, оскільки для виконання цієї роботи по-

трібно багато часу. Тому нині використовують більш продуктивні, швидкі методи визначення концентрації сперміїв: за допомогою фотоелектроколориметра, оптичних стандартів і стандартів мутності (каламутності).

Визначення концентрації сперміїв за допомогою фотоелектроколориметра ФЕК-М. Це складний прилад, і принцип роботи якого полягає в тому, що крізь кювету з досліджуваною (попередньо розбавленою) спермою пропускають пучок світла певної довжини, який потім потрапляє на селеновий фотоелемент, що з'єднаний з гальванометром. Через гальванометр і проходить електричний струм, величина якого обернено пропорційна мутності сперми, тобто концентрації сперміїв.

Пристаючи до роботи з приладом, необхідно уважно вивчити інструкцію, потім приєднати стабілізатор, гальванометр і перевірити справність їх.

Перед початком роботи (за 15-20 хв) вмикають фотоелектроколориметр і відповідною ручкою встановлюють червоні світофільтри. Лівий відрахунковий барабан обертанням встановлюють по червоній шкалі в положення «0» – шкала оптичної густини. Потім заздалегідь приготуваним і профільтрованим 3,5 %-м розчином цитрату натрію розбавляють свіжовзяту сперму бугая у співвідношенні 1:100, барана – 1:400, кнура – 1:30. Для цього у флакон наливають 10 мл розчину (для сперми кнура 12 мл), мікропіпеткою відбирають 0,1 мл сперми бугая або 0,025 мл сперми барана і вносять її у флакон з розчином. Для того щоб усі спермії попали в розчин, мікропіпетку промивають кілька разів тим самим розчином, в який вносили сперму. Розчин і сперму добре перемішують, наливають у кювету фотоелектроколориметра з робочою довжиною 10 мм і швидко визначають її оптичну густину. Для цього на шляху проходження пучка світла ставлять у лівий кюветотримач чисту кювету, наповнену 3,5 %-м розчином цитрату натрію, а в правий кюветотримач – дві такі самі кювети, тільки одну з розбавленою спермою, а другу з розчином цитрату натрію. Встановивши кювети, закривають кришку приладу і включають гальванометр спочатку в положення «1» (груба чутливість), а потім у положення «2» (висока чутливість). Відхилення стрілки гальванометра, яка реєструє струм, встановлюють у положення «0» обертанням рукоятки фотометричних клинів. У правому кюветотримачі кювети міняють місцями так, щоб на шляху

проходження світла була кювета з чистим розчином. Гальванометр включають знову, ручкою відлікового барабана доводять стрілку гальванометра до позначки «0», після чого відразу виключають гальванометр і відлічують за червоною шкалою лівого барабана величину оптичної густини. Знаючи цю величину, концентрацію спермій визначають за попередньою складеною градувальною (калібрувальною) кривою.

4. Оцінка сперми за знебарвленням метиленового синього. Визначення концентрації спермій кнура за допомогою оптичного стандарту. Стандарт – це запаяна пробірка з рідиною, оптична густина якої відповідає оптичній густині сперми кнура з концентрацією спермій 50 млн/мл. До стандарту додається порожня пробірка такого самого діаметра, в яку наливають 1 мл 1 % -го розчину хлориду натрію, мікропіпеткою додають 0,1 мл свіжовзятої профільтрованої сперми. Стандарт і пробірку із спермою кілька разів струшують і прикладають газетний або книжковий текст. Потім у пробірку із спермою порційно (по 0,5-1,0 мл) додають 1 %-й розчин хлориду натрію доти, поки висота літер шрифту та оптична густина стандарту не зрівняється, тобто оптична густина рідини в обох пробірках має бути однаковою. Визначення концентрації спермій жеребця за допомогою стандартів мутності. Цей метод дає приблизне уявлення про концентрацію спермій. Стандарти – це скляні запаяні пробірки однакового діаметра з мутною рідиною, на вигляд, подібною до сперми жеребця. Мутність рідини у різних пробірках відповідає різній концентрації спермій у спермі жеребця: 10, 50, 100, 200, 300 і 500 млн/мл. До стандартів додається порожня пробірка, в яку наливають досліджувану сперму жеребця і, дивлячись на світло, за мутністю добирають до неї стандарт. Для більшої точності до порівнюваних пробірок ззаду щільно приставляють скляну паличку. Крім обов'язкової оцінки кожного еякулята за об'ємом, зовнішніми ознаками, густотою сперми, активністю та концентрацією спермій часто треба провести детальну його оцінку за деякими фізіологічними та біохімічними показниками для виявлення і своєчасного усунення причин зниження запліднювальної здатності спермій. За допомогою цього методу можна встановити якість сперми, оскільки існує тісний зв'язок між інтенсивністю дихання спермій і запліднювальною здатністю самок. Основою методу є здатність спермій при нестачі кисню знебарвлювати метиленовий синій. Чим

більша у спермі кількість сперміїв і чим інтенсивніше їхнє дихання, тим швидше знебарвлюється метиленовий синій. Якщо сперма бугая знебарвлюється менш як за 10 хв, то вона доброякісна, від 11 до 30 хв – середньої якості, понад 30 хв – погана і непридатна для осіменіння. Сперма баранів знебарвлюється значно швидше: доброї якості до 7 хв, середня – за 8-12 хв, погана – понад 12 хв.

5. Визначення відсотка живих сперміїв способом зажиттєвого забарвлення. Обидві краплі швидко перемішують і за допомогою гострої грані шліфованого скла рухом убік від себе готують мазок (якомога тонший). Висушивши мазок на повітрі, кладуть його під мікроскоп із збільшенням у 300-400 разів і підраховують (підряд) не менш як 500 сперміїв у кількох полях зору, зазначаючи окремо спермії із забарвленими (в рожевий колір) і незабарвленими головками. Потім обчислюють відсоток живих сперміїв (П) за формулою: Цей показник визначають для того, щоб виявити, чи немає в самця захворювань статевих органів і насамперед захворювань сім'яників та придатків. З хворих сім'яників часто виділяється велика кількість виродливих, патологічних сперміїв – велетенських, карликових, двоголових, двохвостих з деформацією головки або хвоста та ін. Таке явище називається тератоспермією.

Для визначення відсотка патологічних сперміїв роблять на чистому знежиреному предметному склі тонкий мазок досліджуваної сперми, висушують його, фіксують у 96% -му спирті протягом 5 хв, промивають водою, потім забарвлюють чорнилом або будь-яким мікробіологічним барвником, промивають водою і висушують. Після висихання мазок досліджують під мікроскопом при збільшенні у 600 разів. Спермії підраховують у кількох полях зору при загальній їх кількості не менш як 500. Причому підраховують окремо спермії нормальних і окремо патологічних форм, а потім обчислюють за формулою. Відсоток патологічних форм сперміїв у кожного плідника визначають не менш як 2-3 рази на рік

ЛЕКЦІЯ 4

Анатомія і фізіологія статевих органів самок

План:

1. Анатомо-гістологічна будова і видові особливості статевих органів самок.
2. Дозрівання фолікулів
3. Овогенез
4. Жовті тіла, їх розвиток і будова
5. Статеві гормони, їх практичне значення
6. Статева, господарська і повна зрілість самок

1. Анатомо-гістологічна будова і видові особливості статевих органів самок. Система органів розмноження тварин забезпечує передачу генетичної інформації від покоління до покоління. За умови статевого розмноження у сільськогосподарських тварин це здійснюється шляхом гаметогенезу, запліднення, вагітності, родів. У цьому процесі приймають участь яйцеклітини, які характеризуються тим, що не володіють здатністю самостійно рухатись, мають порівняно великі розміри і значний запас поживних речовин та спермії, які характеризуються здатністю самостійно рухатись, мають невеликі розміри, не мають достатнього запасу поживних речовин.

За умови статевого розмноження зустрічаються організми, у яких гамети самок і самців однакові за будовою і функцією. Зустрічаються організми, у яких гамети самок і самців відрізняються за будовою і функцією. За цих умов чітко розрізняються дві форми організмів – самця і самки.

Система статевих органів самок і самців розрізняється на наступні: порожнинні (з наявністю внутрішніх порожнин) та безпорожнинні (паренхиматозні); на внутрішні статеві органи (знаходяться в середині організму) та зовнішні (знаходяться назовні); на парні (наприклад, лівий та правий яєчники) та непарні (наприклад, тіло матки, шийка матки, піхва). Система статевих органів поділяється на статеві залози та провідні статеві шляхи. А статеві залози у свою чергу поділяються на головні та додаткові.

Статеве розмноження тварин пов'язане з гаметогенезом і злиттям гамет самців і самок, що одержало назву запліднення.

Забезпечення умов для запліднення супроводжується комплексом статевих природжених (безумовні) і набутих (умовні) статевих рефлексів. Система органів розмноження самок сільськогосподарських тварин (*organagenitalia feminina*) включає:

Головні статеві залози – яєчники (*ovarium, oophoron*);. Провідні статеві шляхи – яйцепроводи, роги, тіло, шийка матки, піхва (*tuba, uterina, s. oviductus, salpinx; metra, vagina*);. Місце розвитку плоду – матка (*metra, uterus, hysterd*); Органи спарювання – піхва (*vagina*), сечостатеве переддвір'я (*sinus urogenitalis, s. vestibulum*), зовнішні статеві органи - вульва, переддвір'я (присінок) піхви, клітор (*vulva, pudendum femini*). Піхва і переддвір'я (присінок) піхви одночасно є і родовими провідними шляхами. До внутрішніх статевих органів відносяться піхва, матка, яйцепроводи, яєчники. До парних статевих органів відносяться яєчники, яйцепроводи, роги матки; до непарних - тіло та шийка матки, піхва, переддвір'я піхви, клітор. Статеві залози представлені яєчниками (головні), залози слизових оболонок провідних статевих шляхів (додаткові), молочна залоза. Провідні статеві шляхи для сперміїв і зиготи представлені маткою і яйцепроводами, а для плоду – шийка матки, піхва, переддвір'я піхви.

Розміри і функція тієї чи іншої частини статевих органів самок залежать від виду, віку, породи, фізіологічного стану організму тварин.

Яєчники (*ovaria*) – парний орган представлений паренхимною і строною, у більшості тварин овальної, мигдалеподібної, у птахів гроновидної форми, у свиней – за формою нагадують ягоду шовковиці. Це головні статеві залози, які 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 родили. 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

обумовлено наявністю великої кількості фолікулів і жовтих тіл. З цієї не 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. У 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 області малої кривизни знаходяться ворота яєчника, через які до них проникають судини та нервові волокна.

Зовні яєчники покриті білковою оболонкою, під якою знаходиться фолікулярна зона, де мається велика кількість фолікулів на різних стадіях їх розвитку. У фолікулярній зоні розрізняють фолікули безпорожнинні (Граафові тільця) та порожнинні (foliculi ovariei), жовті тіла (corpus luteum), білі тіла та інтерстиціальні тіла або зернисті клітини.

Остов (stroma) яєчника утворюють сполучнотканинні пластинки та перемички, що проникають у їх товщу. Тут у великій кількості розгалужені кровоносні і лімфатичні судини, нервові волокна та гладенькі м'язові волокна.

Наймолодші фолікули складаються лише з однієї яйцевої клітини та епітеліальної оболонки, що її оточує. Такі фолікули називаються примордіальними. У більш зрілих фолікулів появляється порожнина, заповнена фолікулярною рідиною. Тут знаходиться і яйценосний пагорбок. Зрілий фолікул має подвійну оболонку: зовнішня білкова сполучнотканинна; внутрішня, представлена крупними полігональними клітинами. Ці клітини виконують ендокринну функцію. Із середини оболонка фолікула представлена 5-7 шарами фолікулярних клітин, які утворюють так званий зернистий шар. На одній ділянці цей шар потовщується. Це потовщення називається "яйценосним пагорбком", де знаходиться яйцеклітина на стадії ооцита першого порядку. На яйценосному пагорбі розрізняють головку, шийку та основу (тіло).

Порожнина фолікула заповнена рідиною, кількість якої зростає по мірі дозрівання фолікула. Такі фолікули все більшою мірою виступають на поверхні яєчника. їх стінка під внутрішнім тиском розтягується і тоншає. Завершується це утворенням папулки і розриванням стінки фолікула і яєчника, а яйцеклітина з фолікулярною рідиною виводиться з яєчника до лійки яйцепроводу. Це складне біологічне явище називається овуляцією.

Фолікули функціонують як тимчасові залози внутрішньої секреції і є основним джерелом утворення естрогенів - статевих гормонів самок. Головне їх завдання - підготувати організм самки до запліднення, а коли воно здійснюється, то забезпечують зиготі оптимальні умови для розвитку й подальше нормальне протікання вагітності. Продукування естрогенів здійснюється за чітким ритмом і носить циклічний характер. Наприклад, у корів, свиней, кобил статевий цикл становить у середньому 19-21 день, овець –15-17 днів, у кіз 8-15 днів

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 грубки, які сполучають яєчник з рогами матки. Розрізняють лійку, ампулу, тіло і істмус яйцепровода. Закладені яйцепроводи у товщі широкої маточної зв'язки і нею утримуються.

Передній кінець яйцепроводу утворює лійкоподібне розширення (*infundulum tubae uterinae*), край якого посічений і називається бахромкою яйцепровода (*fimbria tubae*), що охоплює яєчник і вловлює яйцеклітину після овуляції. Слизова оболонка внутрішньої поверхні лійки зібрана у дрібні поздовжні складки. Яєчник добре охоплюється бахромкою досить крупної лійки яйцепроводу у свиней, гірше - в однокопитних (наприклад, коней, зебр, ослів) головним чином лише з боку малої кривизни яєчника, а у жуйних невелика лійка з бахромкою охоплює яєчник лише з боку великої кривизни.

Яйцепроводи вільно відкриваються до перитоніальної порожнини краніальним черевним отвором. Цей отвір порівняно невеликого діаметру і знаходиться приблизно у центрі дна лійки.

Ампула яйцепроводу має більший діаметр, ніж тіло і особливо істмус (це найвужча частина каналу яйцепроводу).

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

У жуйних і свиней істмус яйцепровода поступово переходить у ріг матки, але так, що між ними можна помітити досить чітку границю, яку ряд вчених вважають за сфинктер яйцепровода, що регулює надходження спермій до яйцепроводу з матки. У сільськогосподарських тварин розслаблення цього сфинктера спостерігається за 10-15 годин до моменту овуляції.

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

Матка (metra, uterus) розвивається з середнього відділу Мюллерових каналців. Вона представляє собою м'язовий порожнинний орган, що служить плодомістилицем і забезпечує розвиток плоду 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 ріг становить у овець 8-20 см, у корів – 25-50 см, а у свиней – аж 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).

Слизова оболонка матки вистелена циліндричним епітелієм, де закладені трубчасті маточні залози, які відсутні лише в області шийки матки. У жуйних на слизовій оболонці кожного рогу матки є чотири ряди пагорбків - сполучнотканинні утворення, що називаються маточними карункулами. У дрібних жуйних вершини карункулів мають заглиблення (крипти). Крипти карункулів є місцем формування плаценти.

М'язова оболонка матки представлена поздовжніми, косими і кільцевими м'язовими волокнами, що утворюють пласти, між якими проходять кровоносні судини і нервові волокна. Вона добре розвинута, особливо під кінець вагітності. Її скорочування

забезпечують головну силу для виштовхування плоду, який дозрів для народження.

Серозна оболонка оточує матку зовні і завдяки маточній брижейці забезпечує органу свободу руху і переміщення у черевній порожнині, а також значну зміну розмірів матки у процесі вагітності.

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.

Шийка матки виконує ряд функцій, що забезпечують нормальне протікання процесу відтворення. По-перше, шийка матки – це "сховище" сперміїв, де, наприклад, у індичок вони можуть зберігатися протягом 62-72 днів. Існує думка, що в криптах шийки матки здійснюється процес капацитації (як би дозрівання) сперміїв. Зокрема, у птахів шийка матки виконує регуляторну функцію, пропускаючи до місця запліднення яйця тільки певну кількість сперміїв, мінімально необхідних для запліднення яйця (приблизно 2,5 млн.). Шийка матки, певною мірою, виключає імунізацію організму самки гомологічними сперміями. Нині доведена можливість внутрішньоматочної імунізації корів гомологічними сперміями за умови багаторазового не ефективного осіменіння. Шийка матки виконує функцію природного біологічного бар'єра, що профілактує проникнення мікрофлори до матки і місця запліднення. Ця функція матки більш чітко виражена у птахів, корів, овець тощо. Бактеріоцидними і бактеріостатичними властивостями володіють поліцукрові сполуки, полі-L-лізіна, що секретуються слизовими оболонками шийки матки та інших відділів статевих шляхів самок під час статевої охоти. Наприклад, полі-L-лізін по відношенню до золотистого стафілокока є у 250 разів більш активний, ніж лізоцим і Y-глобулін сироватки крові корів.

На шийці матки ніби фіксуються м'язи матки, забезпечуючи опорну функцію при перистальтичних всмоктуючих скороченнях матки під час статевої охоти. Опорна функція шийки матки для міометрія особливо важлива під час родових потуг.

Стінка шийки матки утворена серозною оболонкою, м'язовим шаром та слизовою оболонкою. М'язовий шар представлений добре

розвинутим внутрішнім циркулярним пластом і менш розвинутим зовнішнім поздовжнім пластом волокон гладеньких м'язів. М'язи шийки матки виконують важливу фізіологічну функцію. У нормі канал шийки матки закритий, особливо щільно під час вагітності. Протягом тички і статевої охоти канал шийки матки злегка відкривається і з нього витікає слиз (маточні виділення), а скорочення м'язів шийки обумовлює її всмоктуючі рухи, що сприяє проникненню і транспорту сперміїв до матки.

Слизова оболонка шийки матки вистелена секреторним циліндричним епітелієм. Вона утворює своєрідні поперечні (*palmata*) і поздовжні складки. Поперечні складки поступово підвищуються каудально, круто обриваючись, а потім знову підіймаючись. Таких складчастих підйомів (валиків) мається декілька. Так, у корів їх буває чотири, а у овець – 7-8. Остання така складка вдається до порожнини вагіни, утворюючи вагінальну частину шийки матки. Поздовжні складки слизової оболонки шийки матки утворюються внаслідок природного тонуку циркулярних м'язів геніталій. Цей тонус і забезпечує матці та шийці матки мінімальний отвір, що має біологічне значення і сприяє заплідненню тварин.

Каудальна частина шийки матки корови із зовнішнім отвором у вигляді притупленого конуса виступає до порожнини піхви на 2-4 см. Ця ділянка шийки матки якби порізана радіальними складками різної глибини. Шийка матки овець має довжину 4-10 см. Вагінальна частина шийки матки може виступати до порожнини вагіни у нижній частині на 10-15 мм. Задній кінець шийки матки видається у піхву великої рогатої худоби у вигляді розетки, у вівці - у вигляді риб'ячого рота, у кобили - у вигляді соска, а шийка матки у свині переходить у піхву без різкої межі.

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 де 30 , кобил – 35 , овець і кіз – 12-15 , свиней – 18, сучок – 10 сантиметрів.

Краніально закінчується власне піхва (*vagina proprium*) зводом навколо шийки матки у кобил, корів і певною мірою – у овець і кіз, а

у свиней звод вагіни відсутній, у них піхва представляє собою вузьку лійкоподібну трубку, що поступово переходить у шийку матки.

Стінка вагіни представлена слизовою оболонкою, в якій відсутні залози. Слизова оболонка досить товста і складена у добре виражені поздовжні складки, поперечна складчастість її виражена дуже слабо. Вистелена слизова оболонка піхви багатошаровим, з різною кількістю клітинних рядів, епітелієм. М'язова оболонка піхви досить тонка, дуже пронизана сполучною тканиною з еластичними волокнами. М'язові волокна тут є поздовжні, кільцеві і спіральні. Зовнішня оболонка піхви представлена головним чином сполучнотканинною адвентицією і тільки незначна краніальна її ділянка біля шийки матки покрита серозною оболонкою. У порожнині піхви на межі сечовивідного отвору є підвищення у вигляді валика, що відділяє переддвір'я від власне піхви.

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 багатошаровим 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.

У товщі стінки переддвір'я є значна кількість еластичної тканини, лімфоїдних утворень. М'язовий шар стінки переддвір'я представлений гладенькими м'язовими волокнами, які переходять з каудальної частини піхви, а також поперечно-смугастими, які йдуть від статевих губ. Ці м'язи формують стискувач статевої щілини.

На нижній стінці переддвір'я, біля валика, вузьким, але досить довгим щілиновидним отвором відкривається сечовивідний отвір.

Просторово переддвір'я розміщене косо вниз каудально, що сприяє виділенню сечі, слизу і виділенню дрібних механічних частинок, що можуть потрапити зовні.

Статеві губи (*labia p̄idendi*) 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 розсіяно багато потових і сальних залоз та залягає м'яза-сфинктер, яка замикає статеву щілину. Шкіра статевих губ тонка, зібрана в численні складки.

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

У нижній комісурі статевої щілини знаходиться клітор (clitoris, cunpus) - гомолог статевого члена самців. 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 слабко.

2. Дозрівання фолікулів. Знання анатомії і топографії статевих органів самок має особливе значення для удосконалення техніки штучного осіменіння та правильного використання інструментів, що при цьому застосовуються.

У фолікулярній зоні яєчника міститься велика кількість зародкових клітин, з яких розвиваються фолікули (folliculi 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 яйценосним 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 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. Коли ж у тварини відбуваються роди (отелення, окот, поросіння, вижеребка тощо), а жовте тіло не розсмоктується, то воно називається персистентним жовтим тілом і гальмує охоту у тварин (практично воно функціонує як кіста яєчника). А коли дозріває фолікул, але овуляція його не здійснюється, то він функціонує як фолікулярна кіста яєчника, то такі тварини знаходяться постійно у стані статевої охоти, хоча запліднитись вони не можуть.

3. Овогенез. Овогенез здійснюється у фолікулах. У дозріваючому фолікулі знаходиться ооцит першого порядку. Незадовго до овуляції завершується дозрівання ооциту другого порядку. У яйцепровід яйцеклітина потрапляє на стадії ооциту другого порядку. Без контакту зі сперміями мейоз на цій стадії припиняється. При наявності активних сперміїв спостерігається екваційне ділення і виділення другого полярного (направного) тільця. Перше полярне тільце до цього часу також встигає розділитись на дві частини, у зв'язку з чим у первітлярному просторі (простір між

прозорою і жовтковою оболонками яйцеклітини) можна виявити три морфологічно однакові утворення. Наявність трьох полярних тілець характеризує нормальне завершення мейозу і одержання клітин з гаплоїдним набором хромосом. Яйцеклітина після овуляції оточена декількома шарами клітин яйценосного пагорба. Це утворення називають променистим вінцем або променевою оболонкою яйцеклітини. Відшаровування цих клітин відбувається протягом 4-6 годин навіть без участі сперміїв. Але наявність сперміїв, які при контакті з яйцеклітиною виділяють фермент гіалуронідазу, яка помітно прискорює цей процес, який визначають як перший етап запліднення.

Питання про те, як швидко яйцеклітина після овуляції набуває здатності до запліднення, лишається недостатньо вивченим. Але, судячи з результатів осіменіння тварин у яйцепроводи, що проводилось до овуляції, можна допустити, що цей період не перевищує двох годин.

Після овуляції порожнина фолікула заповнюється кров'ю з розірваних капілярів стінки яєчника і фолікула. А з клітин, що залишилися у периферійних ділянках фолікула швидко виростає новий шар клітин, які замінюють кров'яний згусток. Ці клітини розміщуються шарами, набувають багатокутну форму. У протоплазмі цих клітин відкладається пігмент лютеїн, що надає цьому утворенню жовтий колір (що й визначило назву утворення).

4. Жовті тіла, їх розвиток і будова. 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 ні зі статевим актом, ні з дією якогось іншого зовнішнього фактору. А, наприклад, у кролиць вона здійснюється тільки при 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 аж до 7-12-го дня охоти.

5. Статеві гормони, їх практичне значення. Гормони (грц. *hormao* - збуджую) – біологічно активні речовини, що виробляються в організмі спеціальними клітинами або органами (залозами внутрішньої секреції) і здійснюють спрямований вплив на діяльність інших органів і тканин. Гормони виділяються у кров, приймають участь у регуляції всіх життєво важливих процесів росту, розвитку, розмноження, обміну речовин. Гормональна і нервова системи забезпечують функціонування складного організму тварин як єдиного цілого.

Статеві гормони здійснюють регуляцію функції відтворення. Так, передня частка гіпофіза виробляє гонадотропні гормони, які діють на гонади. Ці гормони не володіють статевою специфічністю, тобто, гіпофіз самки і самця виробляє однаковий гонадотропний гормон.

Гіпофіз секретує статеві гормони фолікулостимулюючий (ФСГ), що стимулює ріст і розвиток фолікулів; лютеонізуючий (ЛГ), що стимулює овуляцію, ріст і розвиток жовтого тіла.

Яєчники секретують естрогенні гормони, що регулюють формування вторинних статевих ознак.

Фолікули секретують гормон фолікулін, що стимулює статеву охоту і прояв статевої домінанти. А гормон жовтого тіла прогестерон, навпаки, пригнічує статеву домінанту і стимулює прояв материнської домінанти. Термін "онтогенез", введений у науку в 1866 році німецьким біологом Е. Геккелем, означає сукупність перетворень, що здійснюється від запліднення до смерті організму. Нині його періодизація досить глибоко вивчена. Так, онтогенез поділяють на

періоди пренатальний (до народження) і постнатальний (після народження). У свою чергу пренатальний період поділяють на підперіоди ембріональний і плоду. Ембріональний підперіод у свою чергу поділяють на періоди зиготи, бластули, морули, гастрюляції зародкових листків, гістогенезу і органогенезу, а потім настає період плоду. Період плоду завершується актом родів.

Постнатальний період прийнято поділяти на підперіоди молозивний, молочний, становлення травного тракту, статевої, господарської і повної зрілості організму.

З практикою штучного осіменіння найбільш тісно пов'язані статева, господарська і повна зрілість організму.

6. Статева, господарська і повна зрілість самок. Статевої зрілості тварини досягають, коли вперше у комплексі здійснюються всі статеві рефлекси, завершуючись у самок овуляцією біологічно повноцінної яйцеклітини, здатної до запліднення. У диких тварин це співпадає з досягненням твариною повної зрілості організму. Завдяки природному відбору недорозвинуті тварини є не конкурентоздатними у боротьбі за виживання і народжують слабкий приплід, нездатний до конкурентної боротьби за виживання. У основних видів сільськогосподарських тварин статева зрілість настає у віці, коли вони ще недостатньо розвинені. Так, велика рогата худоба досягає статевої зрілості у віці 8-9 місяців, вівці – у 9-11, свині – у 5-6 місяців. Якщо за цих умов самка стане вагітною, то вона нездатна народити нормально розвинений плід без шкоди для власного здоров'я. Тому у зооінженерну практику введено як би штучний період онтогенезу – "господарська зрілість".

Господарська зрілість - це такий стан розвитку організму самки, коли вона здатна народити здоровий плід без шкоди для власного здоров'я. Самки всіх видів сільськогосподарських тварин досягають господарської зрілості тоді, коли їх жива маса становить 70-75% від живої маси дорослих добре розвинутих тварин. Так, самки великої рогатої худоби статевої зрілості досягають у віці 8-9 місяців, а господарської, коли їх жива маса перевищує 300 кг, тобто у віці 13-15 місяців і старше; вівці статевої зрілості досягають у 9-11 місяців, а господарської – у 18-20 місяців; свині статевої зрілості досягають у 5-6 місяців, а господарської – у 7-9, коли їх жива маса перевершує 100 кг.

ЛЕКЦІЯ 5

Фізіологічні основи трансплантації ембріонів.

План:

1. Значення трансплантації ембріонів тварин.
2. Відбір тварин-донорів та вимоги до них.
3. Відбір тварин-реципієнтів.
4. Викликання суперовуляції у донорів.

1. Значення трансплантації ембріонів тварин

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

Статевий цикл в корів в нормі складає в середньому 21 день, з відхиленнями від 17 до 24 днів і поділяється на чотири періоди: еструс, метеструс, дієструс та проеструс. Еструс характеризується проявленням охоти, яка продовжується в середньому від 10 до 14 годин з коливанням від 3 до 36 годин. В цей період швидко росте фолікул на яєчнику. В корів овуляція настає після закінчення охоти через 10–15 годин з коливаннями від 10–54 годин, або через 24–30 годин після початку охоти.

Ріст фолікулів забезпечує збільшення рівня гіпофізарного ФСГ в крові. В передовуляційний період баланс гіпофізарних гормонів зміщується від ФСГ до ЛГ (лютеонізуючий гормон), завдяки чому відбувається овуляція і початок формування жовтого тіла.

Метеструс, або період після охоти, продовжується 3 дні і характеризується припиненням вироблення яєчниками естрадіолу, тому зменшується гіперемія, набухання і ослизнення вульви, піхви і шийки матки.

В дієструс, або лютеальну фазу, повністю розвивається жовте тіло, яке секретує гормон прогестерон, під впливом якого ендометрій матки розвивається для підтримки вагітності. Якщо вагітність не

наступає, жовте тіло функціонує тільки 17–19 діб, а після дегенерує, що вказує на підготовку до нової охоти.

Проєструс, або підготовчий період, характеризується підвищенням в організмі рівня ФСГ, під впливом якого підвищується і посилюється ріст фолікулів, які в свою чергу збільшують секрецію естрогенних гормонів – естрадіолу, естрону і естріолу. Під впливом естрогенів посилюється кровопостачання статевих органів. Слизова шийки і матки набуває яскраво-червоного кольору, вульва, піхва і шийка матки набухають, починається виділення слизу з цервікального каналу – настає слідуючий статевий цикл.

2. Відбір тварин-донорів та вимоги до них.

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

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

- молочна продуктивність за декілька лактацій повинна на 50–60 % бути вище стандарту породи, а вміст жиру і білку в молоці – рівним або вищим за стандарт;
- корова повинна мати відоме походження, мати в родоводі видатних предків, підтверджене племінним свідоцтвом;
- при відборі враховується форма вимені, швидкість молоковіддачі, резистентність до стресових явищ виробництва.

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

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

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

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

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

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

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

3. Відбір тварин-реципієнтів.

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

При відборі реципієнтів виходять з таких вимог до них:

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

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

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

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

4. Викликання суперовуляції у донорів.

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

Викликання суперовуляції за допомогою СЖК.

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

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

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

побічних явищ вводити залишкову кількість. При застосуванні очищених препаратів СЖК, таких як фолігон, немає потреби робити пробу.

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

Таблиця 1

Схеми підготовки корів-донорів за допомогою СЖК

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

За “0” день циклу приймається день спонтанної повноцінної охоти. В цей день проводиться дослідження статевих органів, при

потребі санація матки та вводяться внутрішньом'язево вітамінні препарати.

На 10–12 день циклу проводять ректальне дослідження і якщо яєчник має повноцінне жовте тіло, то починають гормональну обробку донора з метою викликання суперовуляції. Введення препаратів повинно проводитись в один і той же час, краще вранці або ввечері.

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

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

Викликання суперовуляції за допомогою ФСГ.

Фолікулостимулюючий гормон (ФСГ) – гормон передньої долі гіпофізу, він сприяє росту фолікула і дозріванню яйцеклітини. ФСГ при викликанні суперовуляції дає більш високі і стабільні результати в порівнянні з ГСЖК. Так ФСГ забезпечує значно більший вихід якісних і нормальних ембріонів на одного донора. Якщо при введенні ГСЖК вихід нормальних ембріонів складає в середньому 3–5 за одну обробку, то ФСГ забезпечує значно більший вихід ембріонів – 7-10. При введенні ФСГ зустрічається менше випадків залишкових патологічних явищ в яєчниках. Реакція яєчників на ФСГ менш

бурхлива, ніж при введенні ГСЖК. Яєчники хоча і вміщують більше розвинутих фолікулів, але не так сильно збільшуються в об'ємі і не такі чутливі при пальпації. Єдиним недоліком схем застосування ФСГ є багаторазовість його введення, що може викликати небажані стресові явища та потребує значних затрат праці.

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

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

Таблиця 2

Схеми підготовки корів-донорів за допомогою ФСГ

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

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

день статевого циклу і вводять ФСТГ вранці і ввечері зменшуючи дозу з 12 мг у 1-й день обробки до 6 мг на 4-й.

На 3-й день обробки коровам вводять синтетичний аналог простагландину F_{2α}. Вимивали 5-6 якісних ембріонів, придатних до пересадки та заморожування. Для проведення планомірної підготовки до трансплантації груп донорів і реципієнтів складається гормонограма.

ГОРМОНОГРАМА підготовки корів-донорів і телиць-реципієнтів

Господарство _____ району _____ області _____
(при використанні фолітропіну) 200_ рік

№ п/п	Назва заходів	Група донорів				
		Приклад	I	II	III	IV
1.	Відбір корів після отелу до	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 (при наявності жовтих тіл яєчників) введення вітамінів А, Д, Е	25.02				
8.	Друге введення естрофану (при наявності жовтих тіл яєчників) введення вітамінів А, Д, Е	07.03				
9.	Виявлення статевої охоти	10.03				
10.	Визначення прогестерону	10.03				
11.	Контроль жовтого тіла яєчників і введення вітамінів А, Д, Е	19.03				
12.	Введення фолітропіну-I (8 – 20 год.)	20.03				
13.	Введення фолітропіну-II (8 – 20 год.)	21.03				
14.	Введення фолітропіну-III (8 – 20 год.)	22.03				
15.	Введення фолітропіну-IV (8 – 20 год.)	23.03				
	Введення естрофану (8 – 20 год.)	23.03				
16.	Осіменіння (8 – 19 год.)	25.03				
17.	Повторне осіменіння через 12 год.	26.03				
18.	Вимивання ембріонів	01.04				
Відбір тварин-реципієнтів						
1.	Відбір реципієнтів	29.01				
2.	Гінекологічне обстеження	05.03				
3.	Інв. номер реципієнтів					
4.	Перше введення естрофану (8 год.) введення вітамінів А, Д, Е	11.03				
5.	Друге введення естрофану – 16 год. (при наявності жовтих тіл яєчників) введення вітамінів А, Д, Е	22.03				
6.	Виявлення статевої охоти	25.03				
7.	Контроль жовтого тіла	01.04				
8.	Пересадка ембріонів	01.04				

Гормонограма дозволяє контролювати хід робіт на протязі всього періоду роботи з тваринами. Приведена гормонограма розроблена при застосуванні фолітропіну, аналогічно складається гормонограма для всіх препаратів при трансплантації ембріонів.

ЛЕКЦІЯ 6

Технологія видобування ембріонів у тварин-донорів.

План:

1. Синхронізація статевої охоти донорів та реципієнтів.
2. Осіменіння та запліднення тварин-донорів.
3. Видобування ембріонів.
4. Пошук та оцінка ембріонів.

1. Синхронізація статевої охоти донорів та реципієнтів.

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

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

Синхронність охоти у донорів і реципієнтів повинна бути такою, щоб забезпечити максимум реципієнтів в охоті на протязі доби. При

дворазовій обробці реципієнтів охота спостерігається у 85% телиць через 48-56 годин, у 5% через 72 години, інші приходять в охоту пізніше, або взагалі не приходять. Синтетичний аналог простагландину $F_{2\alpha}$ вводять коровам-реципієнтам разом з введенням його коровам-донорам, а телицям-реципієнтам на 12-18 годин раніше, ніж коровам-донорам.

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

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

2. Осіменіння та запліднення тварин-донорів.

Питання осіменіння донорів потребує ретельного підходу і досконалого вивчення. Часто без яких-небудь причин при вимиванні ембріонів одержують незапліднені яйцеклітини. При цьому слід враховувати, що овуляція при великій кількості розвинутих фолікулів, як правило, не відбувається синхронно і часто затягується до 36-56 годин, тому рекомендують збільшувати кратність осіменіння корів-донорів. Тобто осіменяти необхідно на протязі всієї охоти, через 12 годин, щоб в одноразовій дозі сперми було 50-70 млн активних сперміїв.

Найкращі наслідки осіменіння корів-донорів одержуються при застосуванні ректо-цервікального способу осіменіння. У корів-донорів, оброблених препаратами гонадотропину, охота сильно виражена, яскрава. Майже в усіх них відкрита шийка матки і сперму вдається ввести значно глибше в канал шийки матки. Але слід враховувати, що оброблені корови донори мають підвищену чутливість статевих органів до ректальної пальпації і інфекції, тому

осіменяти необхідно дуже обережно. Необережні маніпуляції можуть викликати зміщення бахромки яйцепроводу і тоді не всі яйцеклітини попадають в яйцепровід. Крім того, необережна пальпація яєчників може викликати передчасні розриви передовуляційних фолікулів і вихід незрілих яйцеклітин.

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

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

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

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

При проникненні спермія через прозору оболонку яйцеклітини, він втрачає акрозому і плазматичну мембрану і прикріплюється до жовткової оболонки. В яйцеклітині це викликає активізацію обмінних процесів і друге ділення ядра з виштовхуванням 2 полярного тільця.

Головка і шийка спермія проникають в цитоплазму яйця, а відділений хвостик залишається в коложовтковому просторі. Головка спермія збільшується до розмірів ядра яйцеклітини, яке трансформується в жіночий пронуклеус, а головка в чоловічий. Чоловічий і жіночий пронуклеуси наближаються і, втративши оболонки, перетворюються в хромосомні набори, які об'єднуються в ядро нової клітини – зиготи, яка має диплоїдний набір хромосом.

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

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

3. Видобування ембріонів.

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

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

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

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

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

Інструменти для вимивання ембріонів існують різних конструкцій: жорсткі металеві, гнучкі пластикові або гумові. Найбільш широко в практиці трансплантації для вимивання ембріонів використовують двоканальні катетери з гуми або еластичної пластмаси. Катетер складається з трубки, кінець якої – робоча частина – має надувний балончик і 4-6 отворів, які забезпечують введення і виведення промивного середовища. Кінець трубки залитий гумою, пластмасою або має жорсткий наконечник з сквозним отвором для фіксації кінчика стилету.

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

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

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

Вимивання ембріонів проводять на 7–8 – й день від початку статевої охоти. Безпосередньо перед вимиванням корову-донора фіксують в станку, звільняють пряму кишку від калових мас. Зовнішні статеві органи та перинеальну область миють водою з

милом, висушують серветкою, дезінфікують аерозолем “Септонекс” або 70° етанолом. Для зняття напруги прямої кишки проводять сактральну анестезію 2% розчином новокаїну в дозі 5 – 10 мл. Новокаїн вводять між останнім крижовим і першим хвостовим хребцями. Донорам можна вводити внутрішньом’язево міорелаксанти – рампуноль 0,5 – 0,7 мл або комбілен 0,7 – 1,0 мл.

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

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

По закінченню вимивання з балончика катетера випускають повітря і, витягнувши катетер, ще раз ретельно промивають систему, щоб змити ембріони з стінок. Можна не виводити катетер назовні, а довести його до біфуркації і знову вставивши стилет, завести в другий ріг матки. аналогічно вимивають і другий ріг.

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

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

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

Прокол або розрив ендометрію, які можуть виникати при великому або швидкому наповненню балончика повітрям. В цьому випадку промивне середовище попадає під міометрій і відтік його стає важким. Тому повітря необхідно вводити поступово, нешвидко порціями до 10 – 15 – 20 см³ (мл).

Пошкодження слизової оболонки матки, які можуть виникати за інтенсивних маніпуляцій при промиванні рогу матки, стисканні рукою та використанні безманжетних катетерів. при цьому в промивній рідині з'являється кров. Слід враховувати, що при вимиванні катетер від скорочення м'язів матки поступово виштовхується з рогу в тіло матки. Тому постійно необхідно контролювати розміщення катетера в розі матки.

4. Пошук та оцінка ембріонів.

Вся робота по пошуку і оцінці ембріонів повинна проводитись в спеціальному стерильному боксі при температурі 25 – 26° С. 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.

При пошуку і оцінці ембріонів працюють в конкретній послідовності. Після вимивання ембріонів з статевих шляхів корів-донорів ємкості з промивною рідиною переносять в термостат при температурі 37° С, 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 розкреслено на квадрати 1x1 см. Під біноккулярною лупою або стереоскопічним мікроскопом при 14–28-кратному збільшенні знаходять ембріони і за допомогою шприця з скляною прозорою голкою переносять в малі чашки Петрі в поживне середовище для короткотермінового зберігання і оцінки. Можна 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 ситичком, діаметр отворів якого 90–100 мк, тому ембріони лишаються в ємкості, їх розмір коливається від 130 до 150 мк. 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.

Оцінку якості ембріонів проводять 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 слідуючі:

- 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 – вилупившийся або еспандьований ембріон.

Суперовуляція обумовлює неодночасне запліднення яйцеклітин, тому в промивній рідині можна спостерігати ембріони різного віку, про що свідчать дані таблиці 3.

Таблиця 3

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)	Еспандьований 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

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

Відстаючи 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 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.

Показники розвитку ембріонів наведені в таблиці 4.

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 поррахувати	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 полость	малий
Бластоциста	300-480	140-200	сферична	Чітко виділяється ембріональний диск і трофобласт, полость бластоцисти розширена.	малий
Пізня бластоциста	1200-1500	200-400	сферична	Прозора оболонка тонка, розтягнута полость бластоцисти і займає всю прозору оболонку	немає
Еспандьований ембріон	більше 1500	200-800	сферична або злегка видовжена	Ембріон не має прозорої оболонки, оточений одним шаром клітин трофобласту	немає

ЛЕКЦІЯ 7

Оцінка, культивування та зберігання ембріонів.

План:

1. Прижиттєва оцінка ембріонів з використанням барвників.
2. Оцінка життєздатності ембріонів методом культивування.
3. Кріоконсервація ембріонів.
4. Мікрохірургічне ділення ембріонів.
5. Пересадка ембріонів реципієнтам.

1. Прижиттєва оцінка ембріонів з використанням барвників.

Цей метод засновується на різниці ступеня проникнення барвників через прозору оболонку живих або загинувших ембріонів. Для фарбування використовують: акридиноранж (АО), флюоресцеїн диацетат (ФДА), 4,6-діаміно-2-фенілліндол (ДАП), 2,7-діаміно-10-етил-9-фенілфенантрідіум бромід (ЕБ), 1-аніліно-8-сульфонат (1,8-АНС).

Прижиттєву оцінку ембріонів проводять таким чином: його розміщують на предметному склі, додають відповідний барвник, проводять інкубацію і досліджують під люмінесцентним мікроскопом.

АО. Використовують барвник в концентрації 1 : 40000 на розчині Локка. Ембріон інкубують в темряві 10 хвилин, після чого барвник відмивають розчином Локка і в краплі цього розчину ембріон накривають покривним скельцем і проводять оцінку під люмінісцентним мікроскопом. Живі ембріони дають червонувате свічення, ті, що загинули – зелене.

ФДА. Застосовують барвник в концентрації 1 : 60000 в розчині Дюльбекко. В якості розчинника ФДА використовують ацетон – 1 мг на 1 мл середовища Дюльбекко. Ембріони інкубують протягом 3 хвилин. Барвник флюоресцює при контакті з гідролазами, які активні тільки в живих клітинах. Загинувши, ембріони не флюоресцюють, а живі флюоресцюють повністю або частково зеленим кольором.

ДАП. Це дуже чутливий реагент на ДНК. Для забарвлення ембріонів 0,1 мг ДАП розчиняють в 1 мл фізіологічного розчину і далі розбавляють розчином Дюльбекко для одержання концентрації 1 : 100000. Інкубація проходить за 10 хвилин при температурі 22° С.

ембріони оцінюють в відбитому світлі люмінесцентного мікроскопу. Ембріони, в яких ядра проявляють жовту флюоресценцію – нежиттєздатні, в живих ембріонів ядра не забарвлюються, тому вони не флюоресцюють.

Таблиця 5

Шкала оцінки якості ембріонів

Стадія розвитку	Морфологічна характеристика	Оцінка	Бал	Позначення
Морула рання MoI пізня MoII	*округла форма, ціла прозора оболонка, перевітеліновий простір прозорий, бластомери чіткі, однакового розміру з наявністю полігональних зв'язків, зерниста цитоплазма рівномірна заповнює оболонку	Відмінні	5	++
	*наявність в перевітеліновому просторі гранул і включень, бластомери не однакового розміру, розташовані асиметрично, стиснуті	Добрі	4	+
	*в перевітеліновому 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 БлI пізня БлII	*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 пелюцида потоншена, полость бластоцисти велика, займає весь перевітеліновий простір, має гладку поверхню, чітку диференціацію клітин, бластоціль не виражена в перевітеліновому просторі	Добрі	4	+
	гранули, включення, клітини трофобласту стиснуті мало	Задовільні	3	+ -
	*перевітеліновий простір збільшений, включення, гранули, бластополость не чітка, немає диференціації між клітинами трофобласту і ембріобласту	Умовно придатні	2	+ - -
	*дефекти прозорої оболонки, наявність гранул, клітинних часток в перевітеліновому просторі, часткове руйнування клітин, стиснення бластомерів	Непридатні	1	- - -
*значні дефекти прозорої оболонки, розпад бластомерів, рихле їх з'єднання				

ЕБ і АНС. Для фарбування ЕБ і АНС готують два розчини: перший – 3 мг барвника розчиняють в 3 мл дистильованої води, другий – 0,1 мл вносять в 9,9 мл сольового розчину Хенкса або Дюльбекко. Ембріони занурюють в дві краплі другого розчину, додають одну краплю першого і фарбують протягом однієї хвилини. Оцінюють життєздатність ембріонів при люмінісцентному світлі не більше 10 секунд. В нежиттєздатних ембріонів кліткова мембрана проникна для барвників. Барвник ЕБ зв'язується в клітині з нуклеїновими кислотами і люмінісцює червоно-малиновим світлом. АНС з'єднується в клітині з білками і дає блакитну люмінісценцію. Живі ембріони не фарбуються і не дають люмінісцентного свічення.

2. Оцінка життєздатності ембріонів методом культивування.

Біологічно повноцінні ембріони при забезпеченні оптимальних умов культивування продовжують свій розвиток. В якості поживного середовища для культивування ембріонів використовують середовища: ТС – 199, Хем Ф – 10, Ігла, сольовий розчин Дюльбекко, Брінстера з різними біологічними і синтетичними добавками. Осмотичний тиск поживних середовищ чи розчинів для культивування ембріонів повинний бути 300 міліосмолей, рН – 7,2-7,4. Культивування ембріонів можна проводити в краплях поживного середовища в годинникових скельцях під шаром вазелінового масла.

В стерильні годинникові скельця переносять піпеткою 25 крапель стерильного вазелінового масла, після цього шприцем і тонкою голкою підпускають під вазелінове масло 0,1 мл поживного середовища. Годинникове скельце розміщують в чашки Петрі і встановлюють в ексікатор, який ставлять в термостат при температурі 37° С. Протягом 10 – 20 хвилин через ексікатор пропускають газову суміш, яка має 90 % азоту, 5 % вуглекислого газу і 5 % кисню.

Після цього з годинникових скелець, що знаходяться в ексікаторі, шприцем видаляють поживне середовище і в свіжій порції поживного середовища поміщують ембріон під вазелінове масло. Чашки Петрі з годинниковими скельцями знову переносять в ексікатор при 37° С і знов пропускають газову суміш, попередньо фільтруючи і зволожуючи її. Ексікатор щільно закривають, шланги для вводу газової суміші герметично перекривають зажимами і залишають в термостаті на період інкубації. Для контролю за рН в

ексикатор ставлять бюкс з поживним середовищем, в яке додають індикатор феноловий червоний. При рН 7,2 – 7,3 феноловий червоний в розчині має оранжево-червоний колір. При залужуванні колір контрольного середовища буде малиновим, при закисненні - оранжевим.

Більш простий метод культивування в пробірках та пайєтах. Для культивування в пробірках ембріони піпеткою переносять в пробірку з 1 мл поживного середовища і після додавання трьох крапель стерильного вазелінового масла, закривають алюмінієвою фольгою і переносять в термостат при температурі 37° С для інкубації. В паєту ембріон заправляють в такій послідовності:

- 20 % розчин фетальної сироватки в розчині Дюльбекко (30 – 45 мм),
- повітряний пухірець (5 – 10 мм),
- 20 % розчин фетальної сироватки в розчині Дюльбекко з ембріоном (20 – 30 мм),
- повітряний пухірець (5 – 10 мм),
- 20 % розчин фетальної сироватки в розчині Дюльбекко (30 – 45 мм).

Паєти з ембріонами закривають пробками і кладуть в поліетиленові трубки, які герметично запаюють і переносять в термостат для інкубації.

Також можна зберігати ембріони при пониженні температури. Охолодження ембріонів нижче температури тіла, але не нижче 0°С, дозволяє знизити в них метаболізм, уповільнити розвиток, що подовжує термін зберігання. Використовують охолодження до 0°С, але оптимальна температура 8 – 10°С. Термін зберігання 3 – 4 доби. Через 5 діб життєздатність ембріонів різко знижується, але зовнішньо дегенерації не спостерігається, такі ембріони не приживаються після пересадки. Встановлено, що пізні морули краще переносять охолодження, ніж ранні, а виживання бластоцист при 0°С складає 92% і не відрізняється від свіжих при зберіганні 2 доби при 4°С.

Використовують також культивацію ембріонів в репродуктивних шляхах проміжного реципієнта (*in vivo*) для транспортування і після реконструкції ембріона. Проміжним реципієнтом може бути вівця або лабораторна тварина (кролі, миші), тому що преімплантаційний ембріон толерантний до чужерідного середовища гетерогенного реципієнта. Кращим місцем репродуктивного тракту проміжного реципієнта для культивування

ембріона є яйцепровід. Зберігати ембріони в яйцепроводах реципієнта можна на протязі такого часу, який вони знаходяться в природних умовах, не пізніше денудації. Знаходячись в яйцепроводах реципієнта, ембріони продовжують розвиток, але він може бути повільнішим у порівнянні з нормою. Ці обставини необхідно враховувати при виборі ступеня синхронізації кінцевого реципієнта.

Техніка підготовки проміжного реципієнта не складна. Перед введенням в яйцепровід ембріонів, його перев'язують поблизу матково-трубного з'єднання таким чином, щоб великі судини не попали під лігатуру, тому що перев'яз яйцепроводу разом з судинами веде до загибелі ембріонів. В кожний яйцепровід можна пересадити звичайним способом до 25 ембріонів в невеликій кількості поживного середовища.

3. Кріоконсервація ембріонів.

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

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

Заморожування і відтаювання ембріонів супроводжується кристалізацією води в бластомерах і концентруванням розчинних речовин в рідкій фазі, що приводить до загибелі ембріона. Ці два процеси відбуваються одночасно, хоча кристалізація більш помітна при швидкому заморожуванні, тоді як осмотичні зміни - при уповільненому. Під час заморожування спочатку знижується температура в навколклітинному середовищі, тут поступово

збільшується кількість льоду і збільшується концентрація солей в останній частині розчину. Виникає різниця осмотичного тиску між позаклітинною і внутрішньоклітинною фазами, яка зрівноважується осмотичною реакцією ембріона шляхом віддачі води в навколклітинне середовище. Щоб запобігти кристалізації води в склад середовища вводять кріопротектори гліцерин або диметилсульфоксид (ДМСО), а щоб запобігти осмотичному впливу штучно стимулюють кристалізацію (сидінг). Введення в склад середовища кріопротектора та його видалення також створює можливість пошкодження ембріона. Тому технології заморожування передбачають поступове введення ембріонів в 0,25; 0,5; 1,0; 1,5 М розчині кріопротектору і витримку в кожному розчині 5 - 10 хвилин, а в останньому 15 - 20 хвилин. При відтаюванні ембріонів їх поступово переносять в розчин з зменшенням вмісту кріопротектору.

Розчини кріопротекторів готують на фосфатносолевому буфері Дюльбекко (ФСБ), використовують хімічно чистий диметилсульфоксид - $(\text{CH}_3)_2\text{SO}$ 78,136 спочатку готується 3М розчин - 15,74 мл ФСБ і 4,26 мл ДМСО. Рідкий ДМСО має питому вагу $1,1 \text{ г/см}^3$, то 4,26 мл буде важити 4,68 г, що відповідає 3М концентрації речовин, розчиненої в 20 мл розчину. Далі з 3М розчину ДМСО готують необхідні його концентрації: 1,5 М розчин ДМСО - потрібно взяти 5 мл 3М ДМСО і 5 мл ФСБ: 1,0 М - 4 мл 1,5 ДМСО і 2 мл ФСБ: 0,5 М - 3мл 1,0М ДМСО і 3мл ФСБ: 0,25 М - 3М 0,5М ДМСО і 3мл ФСБ.

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

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

При повільному заморожуванні спочатку охолоджують ембріон від 20°C до 7°C з швидкістю 1°C за хвилину, викликають штучну кристалізацію і тоді охолоджують з швидкістю $0,3^\circ\text{C}$ за хвилину до -36°C , а далі з швидкістю $0,1^\circ\text{C}$ за хвилину до -60°C і переносять в рідкий азот, температура -196°C . Відтаюють ембріон в спиртовій бані з температурою -50°C з швидкістю 4°C за хвилину до -10°C , після

чого переносять на 5 хв. в водяну баню з температурою +20°C. Після переносять ембріон в середовище для видалення кріопротектору.

При швидкому заморожуванні охолоджують ембріон від 20°C до -7°C з швидкістю 1°C за хвилину, викликають штучну кристалізацію і охолоджують далі з швидкістю 0,3°C за хвилину тільки до -30°C, після чого переносять ембріон в рідкий азот. Відтаюють ембріон в водяній бані з температурою 37°C на протязі 30сек. з швидкістю 3,0°C за хвилину.

4. 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.

В 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 з скляних товстостінних або суцільних заготівок. 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 обумовлено 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 бластомерів. 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 в 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 проводять в стерильних боксах в камері або чашці Петрі в ФСБ з 20% фетальною сироваткою під вазеліновим маслом. Використовують при роботі пневмоманіпулятори під контролем мікроскопа з збільшенням 80 – 100 кратністю.

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

1. Ембріон присмоктують до фіксуючої 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 участку, 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 фіксуєчої 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 в 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; - умовнопридатні – не закруглені. Культивування на протязі 16 – 20 годин призводить до утворення морфологічно нормальних розширюючихся бластоцист з полостью, клітинами трофобласту.

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

5. Пересадка ембріонів реципієнтам.

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

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

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

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

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

Підготовку реципієнта проводять таким чином: їх фіксують в станку або на місті в стійлі, миють теплою водою з милом зовнішні статеві органи, витирають серветкою і дезінфікують. Після цього

роблять сакральну анестезію 2% розчином новокаїну 5-7 мл, а сильнозбудливим реципієнтам вводять внутрішньом'язево міорелаксанти комбелен 0,5 або ханегіф 10 мл, рампун.

Розроблено багато пристроїв та катеторів для нехірургічної пересадки ембріонів. Найбільш широке застосування знайшли катетери, які складаються з металевого тіла – трубки і поршня, за допомогою якого ембріон витискають з пайєти, а також захисних кожухів та чохла – французька фірма ІМВ, німецька мінітюб та ін. Перед початком роботи інструменти стерилізують кип'ятінням, висушують і зберігають в настільному боксі під бактерицидною лампою, яку вмикають перед початком роботи. Перед введенням катетера в статеві шляхи його дезінфікують і покривають силіконом. Пасту, в якій знаходиться ембріон, вставляють в наконечник катетера і приєднують до нього поршень, легко натискаючи на поршень, перевіряють, чи виходить крапля середовища з пайєти. Назвні катетера надягають санітарний чохол і вводять катетер по верхньому склепінню піхви до шийки матки. Проривають санітарний чохол.

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

Не рекомендується на протязі двох місяців після пересадки перегру-повувати, вакцинувати та піддавати іншим стресовим факторам реципієнтів. Годівля реципієнтів повинна бути повноцінною, тому що низький рівень, незбалансованість раціону викликає порушення обміну речовин, репродуктивної функції і знижує приживлення ембріонів.

Через 60–90 днів після пересадки ембріонів реципієнтів досліджують на тільність.

ЛЕКЦІЯ 8

Клонування ембріонів тварин.

План:

1. Історія клонування.
2. Види клонування.
3. Методи одержання монозиготних близнюків.
4. Створення химерних тварин.

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.

Отриманий таким чином зародок може дати початок розвитку новому організму, коли його буде трансплантовано до відповідно підготовленого реципієнта. Такий спосіб утворення організмів принципово відрізняється від усіх існуючих у природі, оскільки формування генотипу тварин відбувається не шляхом спонтанного комбінування генів гаплоїдних жіночої і чоловічої статевих клітин під час запліднення, а шляхом активізації вже сформованого набору хромосом диплоїдної клітини. Це дозволяє створювати великі групи (клони) генетично ідентичних особин, коли донором генетичного матеріалу є популяція ембріональних клітин з одного зародка, або навіть одержувати генетичні копії існуючих тварин, коли донорами ядер є соматичні клітини дорослого організму.

Є дві великі сфери застосування клонування в житті сучасного суспільства: наукова – вивчення фундаментальних принципів функціонування живої матерії, і виробнича – копіювання і

тиражування ссавців з унікальними властивостями. Щодо першої, то метод реконструювання ембріона шляхом пересадки ядер є могутнім методичним засобом вивчення таких базових властивостей тваринного світу на клітинному і субклітинному рівні, як роль позаядерної спадковості в формуванні фенотипових ознак, взаємодія

ядра і цитоплазми, диференціація генома протягом онтогенезу, в тому числі терміни та механізми активізації або інактивзації окремих генів та їх комбінацій, можливість втручатися в процес диференціації й інші. Вирішення багатьох актуальних біологічних проблем, таких як вплив різноманітних факторів зовнішнього середовища на організм тварини, реалізація генотипу в залежності від умов навколишнього середовища та ін. буде набагато ефективнішим при використанні клонів тварин.

Щодо другої сфери – застосування клонування у виробничих процесах, то перелік галузей, де цей метод може бути використано, обумовлюється кінцевим продуктом даної біотехнології, а саме нащадками, що є точними генетичними копіями донорського матеріалу, або великою кількістю генетично ідентичних особин. Як метод генетичного копіювання, клонування буде незамінним для відтворення існуючих у природі або створених людиною тварин з унікальними властивостями. Найяскравішим прикладом останнього може стати клонування трансгенних тварин. Як відомо, вартість штучної генної трансформації організму ссавця з метою надання йому принципово нових ознак нині висока, а ефективність такої процедури ще вкрай незадовільна. До того ж, ймовірність отримання ссавця, організм якого продукував би необхідний людині продукт, також залишається поки що дуже низькою. Тому, кожна тварина, виведена методами генної інженерії і здатна бути біореактором певних препаратів медичного чи фармацевтичного призначення, стане вкрай цінною. Щоб напрацювати необхідну для суспільства кількість такого препарату (інсуліну, інтерферону й ін.), потрібно або створювати певну кількість таких трансгенних особин, або відтворити (тобто скопіювати) вже створений один організм. Таким чином, саме комбінування трансгенезу і клонування дозволить розробити новітню, екологічно абсолютно чисту біотехнологію виробництва біологічно активних речовин (ліків, стимуляторів й ін.), якість яких буде максимально наближена до продуктів, що виробляє організм самої людини, і значно перевищує речовини, що синтезують рекомбінантні мікроорганізми. Така біотехнологія зробить справжню

революцію в фармацевтиці та медицині наступного століття.

Всі клітини організму тварин несуть однакову генетичну інформацію. Однак у процесі морфогенезу соматичні клітини диференціюються, внаслідок чого частина генома репресується. Чим вищий рівень спеціалізації клітин, тим менша їх тотипотентність. Ця закономірність була встановлена в експериментах з пересадження ядер.

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 пересажували 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. Якщо брати ядра із клітин зародка на ранній стадії його розвитку - бластули, то майже у 80% випадків зародок нормально розвивається далі і перетворюється на справжнього пуголовка. Якщо ж розвиток зародка, донора ядра, переходить на наступну стадію – гастрული, то лише менш ніж у 20% випадків оперовані яйцеклітини розвивалися нормально. При пересадженні ядер з більш диференційованих клітин (мезодерми й середньої кишки) пізньої гастрული в ембріонів спостерігалось недорозвинення і навіть відсутність нервової системи. Після пересадження ядра із клітин більш пізнього розвитку яйцеклітини взагалі не розвивалися.

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 кишечника плаваючого пуголовка, що вже цілком спеціалізувалися. Ядра яйцеклітин реципієнтів він не видаляв хірургічним шляхом, а руйнував ультрафіолетовими променями. Здебільшого реконструйовані яйцеклітини не розвивалися, але приблизно десята частина з них утворювала ембріони. 6,5% із цих ембріонів досягали стадії бластули, 2,5% - стадії пуголовка а тільки 1% розвився в статевозрілих особин. Однак, поява декількох дорослих особин у таких умовах могла бути пов'язана з тим, що серед клітин епітелію кишечника пуголовка, що розвивається, досить тривалий час

присутні первинні статеві клітини, ядра яких могли бути використані для пересадження. У наступних роботах як сам автор, так і багато інших дослідників не змогли підтвердити дані цих перших дослідів.

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 ripiens*. 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. Слепцовою, 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.

Незважаючи на названі труднощі, перші повідомлення про одержання клонів мишей, ідентичних донору, з'явилися вже у 1981 році. Як донори були використані ембріональні клітини однієї з ліній мишей, узяті на стадії бластоцисти. Вірогідність отриманих даних спочатку була поставлена під сумнів тому, що відтворити результати

проведених експериментів у інших лабораторіях не вдавалося, однак через два роки Дж. Мак Грат і Д. Солтер також досягли успіху. Американські дослідники С. Стік і Дж. Робл, використовуючи методику Мак Грата й Д. Солтера, у 1988 р. отримали шість живих кролів, пересадивши ядра 8-клітинних ембріонів однієї породи в позбавлені ядра яйцеклітини кролів іншої породи. Фенотип народжених повністю відповідав фенотипу донора. У цих експериментах тільки 6 з 164 реконструйованих яйцеклітин (3,7%) розвилися в нормальних тварин.

Перші успішні експерименти з клонування сільсько-господарських 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 бичків 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. Уїлмута (*Ian Wilmut*) з Рослинського інституту отримала клон овець – 5 ідентичних тварин, донорами ядер яких була культура ембріональних клітин.

Я. Уїлмут 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 пересажені 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 енукейовану яйцеклітину. На відміну від амфібій пересадження ядра в ссавців не стимулює ооцит. Тому потрібно четвертий етап – активація ооциту і злиття мембран яйця й ооциту. Під дією електричного імпульсу відбувається

активація ооциту і злиття мембран між ядром клітини донора і еноклейованим ооцитом-реципієнтом. Технологія пересадження ядер клітини сприяла успішному одержанню клонованих живих кроликів, мишей, овець, кіз, великої рогатої худоби і свиней.

Отримання клітин-реципієнтів – це один із перших етапів цієї методики. Як клітин-реципієнтів використовують або зрілі ооцити на стадії метафази II, тобто яйцеклітини, або зиготи. На початку досліджень з клонування тварин клітинами-реципієнтами були одержані *in vivo* яйцеклітини, зиготи або двоклітинні ембріони. Нині при цьому використовують ооцити, що дозрівають в умовах *in vitro*.

Вибір клітин-реципієнтів є досить суттєвим моментом клонування, тож слід враховувати фізіологічні процеси, що відбуваються під час клітинного циклу. Внаслідок проведених експериментальних робіт та аналізу клітинного циклу встановлено, що для отримання клітин-реципієнтів ядер краще використовувати яйцеклітини, ніж зиготи. Для їх отримання потрібно менше часу, менше препаратів і реактивів. Крім того, через непрозорість цитоплазми зигот великої рогатої худоби виникає необхідність центрифугувати зародки, а це зменшує їх життєздатність. До того ж, виходячи з гіпотези про ремоделюючі/репрограмуючі фактори, цитоплазма яйцеклітин здатна репрограмувати дію ядра клітини-донора, а цитоплазма зиготи – ні.

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. 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 еноклеація.

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

Для полегшення введення бластомерів у перивителиновий простір ооцитів жіночі гамети дозволяється попередньо поміщати до

гіпертонічного середовища. Пересадження ізольованих поодиноких бластомерів 8-, 16- і 32-клітинних ембріонів кроля в еноклейовані ооцити, поміщені за 2-3 хвилини перед мікрomanipуляціями в 0,5 М розчину сахарози в розчині *PBS*, і наступне електрозлиття привели до розвитку 22,18 і 15% реконструйованих яйцеклітин відповідно до стадії морули-бластоцисти.

Уведення ядра або пронуклеусу під прозору оболонку в перивителіновий простір, як правило, не призводить до злиття каріопласту з плазматичною мембраною яйцеклітини або зиготи без застосування спеціальних фузогенів – інактивованого вірусу Сендай, поліетиленгликолю (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.

Частота злиття ізольованих бластомерів великої рогатої худоби з еноклейованими 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 енуклейованими 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.

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

ЕСК мають нормальний каріотип, лінії цих клітин можна зберігати в недиференційованому стані в культурі від 3-х місяців до року, заморожувати і відтаювати кілька разів без істотного зниження їх здатності до розвитку. Іншою перевагою ЕСК є те, що вони можуть бути отримані від ліній тварин, що несуть рецесивні летальні мутації або від партеногенетичних ембріонів. ЕСК не диференційовані і після утворення химерних ембріонів з них і звичайних морул або бластоцист можуть брати участь у формуванні різних органів, у тому числі клітин зародкової лінії. Оскільки ЕСК можна генетично трансформувати, з їх допомогою можливе створення трансгенних тварин. ЕСК можуть, імовірно, формувати повноцінний ембріон. Нещодавно проведені на мишах експерименти підтвердили це припущення, показавши принципову можливість злиття ЕСК з енуклейованими ооцитами і одержання реконструйованих ембріонів.

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

Великий інтерес викликають повідомлення К. Кемпбелла зі

співавторами про одержання 5-ти живих ягнят шляхом злиття поодиноких клітин ембріонального диска (ЕД-клітини) 9-денних ембріонів овець з енуклеюваними дозрілими до метафази II ооцитами, при цьому клітинні лінії ЕД-клітин залишалися тотипотентними, принаймні, протягом 3 пасажів.

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 й реалізація соматичного клонування набагато складніша. Це викликано ступенем диференціації генетичного матеріалу клітин, що є донорами ядер для пересадок. Якщо на ранніх стадіях розвитку ембріону (2-4 клітини) всі бластомери є тотипотентними і кожен з них може дати початок новому зародку, то на більш пізніх стадіях ембріогенезу це вже неможливо. Ядра 8-32- клітинних зародків уже диференційовані, але ступінь їх спеціалізації ще не високий, і вони здатні активізуватися в цитоплазмі енуклеюваної яйцеклітини, а створений ядерно-цитоплазматичний гібрид спроможний розвинути в повноцінний зародок. Більш високий ступінь диференціації ембріональних стовбурних клітин, які отримують з внутрішньоклітинної маси бластоцисти, робить завдання реконструювання ембріону з їх ядер ще важчою. Набагато складніше завдання активізувати ядра глибоко диференційованих соматичних клітин. Теоретично це можливо тільки в тому разі, якщо соматична клітина буде на певній стадії мітозу – коли вона не виконує відповідні функції в організмі, а розмножується, тобто певною мірою схожа на ембріональну клітину.

У лютому 1997 року з'явилося повідомлення, що в лабораторії Яна Уілмута в Рослинському інституті (Единбург, Шотландія) розробили ефективний метод клонування ссавців і на основі його використання вивели ягня Доллі. Насамперед, необхідно було виділити ооцити (яйцеклітини). їх витягли з овець породи шотландська чорноморда, помістили у штучне поживне середовище із додаванням ембріональної телячої сироватки за температури 37°C и провели операцію енуклеації (видалення власного ядра). Після цього виникнула потреба забезпечення яйцеклітини генетичною інформацією від організму, який належало клонувати. Для цієї мети

використали різні клітини донора, але найбільш зручними виявилися диплоїдні клітини молочної залози дорослої вагітної вівці. Ці клітини виводили зі стадії росту клітинного циклу, розбавляючи сироватку, і через п'ять днів з'єднували з енуклеїованим ооцитом. Останній потім активували до розвитку за допомогою електричного удару. Зародок, що розвивається, культивували протягом 6-ти днів у штучному хімічному середовищі або яйцепроводі вівці, перетягнутому лігатурою ближче до рога матки. На стадії морули або бластоцисти ембріони (від одного до трьох) трансплантували в матку прийомної.

З 236 дослідів успіх мав лише один, внаслідок чого і народилося ягня Доллі, яке містить генетичний матеріал дорослої вівці, що вмерла три роки тому. Точними молекулярно-генетичними дослідженнями було доведено, що Доллі є клонованою твариною.

Особливий інтерес викликають досліді групи вчених з університету в Гонолулу на чолі з Ріузо Янагімачі. Авторам удалося вдосконалити метод Уілмута, вони відмовилися від електричної стимуляції злиття донорської соматичної клітини з яйцеклітиною й винайшли таку мікропіпетку, за допомогою якої можливо було безболісно витягувати ядро із соматичної клітини й трансплантувати його в яйцеклітину, що позбавлена власного ядра. Крім того, автори використали як донорські ядра відносно менш диференційованих клітин, що оточують ооцит. Нарешті, вдалося синхронізувати процеси, що протікають у яйцеклітині й ядрі, що трансплантується в неї. Це дозволило забезпечити природні ядерно-цитоплазматичні взаємини між ядром і цитоплазмою, оскільки ядро, що трансплантується і диференційоване в певному напрямку, та цитоплазма яйцеклітини до того працювали ніби в різних режимах.

Автори використали для трансплантації ядра клітин, що оточують ооцит (клітин так названого *cumulus oophorus*), клітин Сертолі з сім'яників і клітин, виділених з мозку – нейронів. Ядра, виділені із соматичних клітин, ін'єстували в енуклеїоване яйце за допомогою мікропіпетки. Яйце активували до розвитку, помістивши в спеціальний розчин (так званий *HEPES-CZB*), вільний від кальцію, із додаванням стронцію і цитохалазину. Стронцій активував яйце, а кальцій придушував утворення полярних тілець.

Ембріони культивували до стадії 2-8 клітин, морули або бластули й потім трансплантували в матку прийомній матері, де значна їх кількість імплантувалася і деякі (15-16%) продовжували розвиток. Відсоток виходу народжених мишенят (їх витягували за

допомогою розтину кесарева на 18,5-19-й дні вагітності) був, однак, низький – у різних серіях експериментів від 2,0 до 2,8%. Молекулярні дослідження довели належність ядер народжених мишенят до клітин донора соматичних клітин. Таким чином, принаймні в деяких випадках було доведено здатність ядер соматичних клітин забезпечувати нормальний розвиток ссавців. Отже, одержання клону принципово можливе. Однак, це ще не означає одержання точної копії клонованої тварини. Насправді одержати абсолютно точну копію даної конкретної тварини (а саме така кінцева мета ставиться в експериментах по клонуванню) набагато складніше, ніж це здається за поверхневого знайомства із проблемою.

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 сутужніше оборотні. У деяких організмів, наприклад, у відомого кишкового паразита аскариди, генетичний матеріал у майбутніх зародкових клітинах, залишається незмінним під час розвитку, а в інших, соматичних клітинах викидаються цілі великі фрагменти ДНК – носія спадкоємної інформації. У червоних кров'яних клітинах (еритроцитах) птахів ядра зморщуються в маленьку грудочку й не працюють, а з еритроцитів ссавців, що стоять еволюційно вище за птицю, ядра взагалі відсутні.

Відомо, що в соматичних клітинах у ході їхнього розвитку хромосоми послідовно коротшають на своїх кінцях, у зародкових клітинах спеціальний фермент - теломераза добудовує, 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.

У жаби, як істоти гірше розвиненої, ніж ссавці, ядерні зміни менше виражені. І при цьому відсоток успіху за клонування, як уже відзначали, невисокий (1-2%), а крім того, навіть ті жаби, які досягають у дослідах з клонування дорослого стану, не без дефектів, отже, про точне копіювання донора, на жаль, важко говорити навіть у

цьому найпростішому випадку. Але ссавці значно складніші, ніж жаби за власного організацією й ступенем диференціації клітин. Природно, у них відсоток успіху буде, принаймні, не вище (про що й свідчать результати дослідів Р. Янагімачі). Виникає проблема – як повернути ядра соматичних клітин, що змінилися, до вихідного стану, щоб вони могли забезпечити нормальний розвиток тієї яйцеклітини, у яку їх трансплантували. Успіх буде залежати від того, чи вдалося знайти таку соматичну клітину (із числа так званих *камбіальних*, від лат. *campium* обмін; клітини, що подвоюються), ядро якої ще не втратило свого потенціалу, і так, щоб ще й не ушкодити це ядро в процесі складних хірургічних маніпуляцій. Крім того, умови розвитку в матці різних прийомних матерів будуть розрізнятися, а існує таке поняття, як норма реакції, тобто певні межі коливань прояву даного гена у фенотівій ознаці. Це значить, що в різних умовах розвитку зародка однакові гени будуть виявляти свою дію по-різному. Але ж таких генів тисячі. Отже, імовірність повної подібності клонованих тварин буде не дуже велика.

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. Це можливо за рахунок використання біотехнології, в якій комбінуються клонування як метод розмноження організмів і кріоконсервація як метод введення останніх в анабіоз. Запропонована біотехнологія дозволяє і у разі використання ембріонального клонування передбачати ознаки нащадків за рахунок того, що поки більшість ембріонів клону зберігається в замороженому вигляді - у скрапленому азоті, 1-2 з них пересаджуються реципієнтам і перевіряються за якістю нащадків. Для повторного розмноження і отримання чисельних нащадків використовуються тільки ембріони тих клонів, що мають необхідні господарсько-корисні ознаки. За кількісними та якісними показниками ембріональне клонування наближається до соматичного саме при повторному (багаторазовому) розмноженні зародків, коли клоновані ембріони попереднього покоління є донорами ядер для наступного циклу реконструкції. У цьому разі кількість зародків зростає з геометричній прогресії, а ефективність реалізації біотехнології отримання нащадків з

прогнозованими ознаками наближається до значень, що задовольняють практиків.

Незважаючи на те, що величезні потенційні можливості методу клонування привернули увагу багатьох провідних учених сучасності, що в розвинутих країнах виділяються великі кошти на дослідження в біотехнології тварин як у межах бюджетних асигнувань на науку, так і приватним капіталом, успіхи залишаються поки що незначними. Їх можна оцінити як такі, що показали принципову можливість клонування вищих тварин, але до розробки технологічного процесу, що давав би стабільні та задовільні за економічними показниками результати ще далеко.

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%.

Низький рівень успіху, навіть у разі найпростішого методу – ембріонального клонування, зумовлений впливом на життєздатність реконструйованих ембріонів великої кількості факторів і невивченістю багатьох біологічних процесів, під час яких проводяться маніпуляції. Певною мірою, успіх кожного досліду є результатом майстерності та інтуїції колективу експериментаторів. Тому глибоке вивчення механізмів перетворень, що відбуваються у статевих і ембріональних клітинах у процесі клонування, вдосконалення методик, що застосовуються на різних етапах клонування, має вирішальне значення для подальшого розвитку цього напрямку біотехнології.

3. Методи одержання монозиготних близнюків.

Як зазначалося, темпи селекційного прогресу сільськогосподарських тварин значною мірою гальмують низькі темпи розмноження. Тому одержання від однієї особини великої кількості нащадків сприяє завданням селекціонерів щодо створення високопродуктивних стад тварин. Але запроваджуючи трансплантацію ембріонів, слід пам'ятати, що при цьому отримують не ідентичних донору тварин. Це пов'язано з рекомбінаційною мінливістю, що виникає в процесі перекомбінації спадкового матеріалу батьків. Тому створені у період відбору й підбору унікальні генотипи в наступних поколіннях можуть не відтворюватися. На це вказували класики зоотехнії, які рекомендували використовувати

тварин у тих же типах парування, що раніше дали цінне потомство. На жаль, нині приймають «апріорі» високі продуктивні властивості нащадків, одержаних за трансплантації, але недостатньо вивчають повторюваність оцінок високопродуктивних донорів та їх потомство. Тому назріло питання виведення генетично подібних тварин, тобто особин з ідентичним генотипом. Як відомо, до них належать однойцеві двійнята, що є цінними об'єктами для генетичних досліджень. Усі онтогенетичні зміни, що відбуваються з ними, та реалізований рівень продуктивності залежатимуть лише від умов середовища. Вважають, що дані, отримані від однієї пари близнят, такі ж як і від 50 тварин.

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

Але частота народження близнят досить низька. Наприклад, корови народжують близнят один раз на 500-2000 отелень. Тому розраховувати на ініціацію спонтанного отримання двійнят або трійнят досить складно, а селекція на багатоплідність неефективна через низьку успадковуваність ознаки. Враховуючи ці обставини, спробували розподілити ранні ембріони як окремі бластомери і пересадити їх реципієнтам. Частина з них можна зберігати в умовах глибокого заморожування. Це дає можливість накопичувати частини ембріонів, які у подальшому, за результатами продуктивності їх

генетичних аналогів, що трансплантувалися реципієнтам, відбирають та здійснюють клонування найбільш цінних особин. Таким же чином можна зберігати генофонд деяких порід та видів тварин.

Можливість зазначених маніпуляцій доведено експериментами. Так, у 1979 р. в Гессенському університеті було пересаджено окремі половинки 5-6-денних ембріонів 39 вівцям і одержано 9 ягнят. Потім одержали однойцевих двійнят з 4- та 8-клітинних ембріонів овець, доведено можливість зберігання половинок у замороженому стані й виведення монозиготних двійнят різного віку.

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

Розподілення зародків проводиться на предметному склі в краплі середовища Дюльбекко скляною мікроголкою діаметром 10-15 мкм. Голку невеликими поступальними рухами опускають під кутом 15-20° до площини предметного скла по лінії передбачуваного розрізу на ембріон, який є в зоні *пелюциди* (прозора оболонка, що вкриває ооцит, на поверхні якої розташовані рецептори для розпізнавання сперміями; після запліднення сприяє процесу прикріплення у статевих шляхах самки), до повного розподілу його на дві частини. Мікроголка виконує при цьому дві функції: розподілення ембріона на частини і його фіксацію, що усуває необхідність застосування мікроприсоски.

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

Після розподілу ембріона на дві частини, одержані половинки переносять до термостату і культивують протягом 3-х годин. Якщо за цей час половинки зародків компактизувалися, їх пересаджують реципієнтам без попереднього поміщення в зону *пелюциди*.

Нещодавно розроблено новий спосіб розподілу ембріонів великої рогатої худоби на половинки шляхом проколювання заточеною мікропіпеткою прозорої оболонки бластоцисти, що

розширюється, поблизу внутрішньоклітинної маси (ВКМ) з наступним (через 24 години культивування) відсіканням бластоцисти-половинки, що вилупилася. Таким методом уже отримано дві пари монозиготних телят-близнюків. Даний спосіб, на відміну від звичайного, призводить до дуже малих клітинних витрат за розподілу.

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

Нині мікрохірургічними методами почали розділювати зародки великої рогатої худоби на стадіях морули або бластоцисти. З таких половинок зародків уже одержані телята (США, Англія, Франція, Німеччина). При цьому використовують нехірургічні методи. Так, відібрану із зони пелюцида половинку бластоцисти повертають у власну оболонку, а іншу розміщують у прозору оболонку яйцеклітини або непридатного для трансплантації ембріона.

Дослідженнями встановлено, що для розподілу ембріонів найбільш придатні пізні морули і ранні, або розширені бластоцисти. Ембріони даних стадій розвитку вимивають з рогів матки на 6-8-й день після запліднення донорів.

На 6-й день більшість ембріонів перебуває в стадії морули, а на 7-й день переважна їх кількість представлена бластоцистами. У той же час дослідження показали, що вимиті на 6-й або 7-й день ембріони перебувають на різних стадіях розвитку. Це пояснюється тим, що препарати, які викликають суперовуляцію, індукують неодноточасний вихід яйцеклітин, і тому багаторазове запліднення донорів, що спрямоване на одержання великої кількості ембріонів, призводить до появи нормально розвинених ембріонів на стадіях морули і бластоцист.

Бластоциста є пристосованою стадією розвитку, необхідною для імплантації, і властива ембріогенезу ссавців. Бластоциста складається з двох клітинних популяцій, одна з яких трофктодерма (ТЕ) або трофобласт, необхідна для імплантації, а друга – внутрішня клітинна маса (ВКМ) або ембріобласт – необхідна для розвитку зародка та індукції у ТЕ процесів, без яких неможлива повноцінна імплантація і плаценталії. У формуванні зародкових оболонок крім ТЕ беруть участь і похідні ВКМ.

Морула ссавців – кулясте скупчення бластомерів, позбавлене порожнини, а бластоциста - пухирець, що складається зі стінки (ТЕ),

порожнини з рідиною (бластоціль) і скупчення клітин (ВКМ) на одному з полюсів внутрішньої поверхні ТЕ. Процес утворення порожнини, тобто формування бластоцисти, називається *кавітацією*.

ВКМ і ТЕ ранніх бластоцист розрізняються за рядом властивостей. Так, ізольовані ВКМ не здатні продукувати рідину бластоцїлі, а клітини ТЕ можуть це робити. Клітини ВКМ легко агрегують між собою, а фрагменти ТЕ позбавлені цієї здатності. Якщо трансплантувати ізольовані фрагменти ВКМ і ТЕ в матку самки-реципієнта, то ТЕ індукують *децидуальну реакцію* (зміни, що відбуваються напередодні імплантації в матці, а також зародковий сигнал, який подовжує життя жовтого тіла) і починають імплантуватися. Ізольовані ВКМ, потрапивши до матки, гинуть, не індукуючи в ній децидуальної реакції.

Отриманий з рогів матки матеріал оцінюють під мікроскопом за 80-100-кратного збільшення. На підставі морфологічної оцінки відбирають незапліднені яйцеклітини і ембріони: нормально розвинені, з частковими порушеннями і дегенеровані. За якістю морули і бластоцисти оцінюються як відмінні, хороші, задовільні, умовно придатні і непридатні. Оцінюючі якість ембріонів враховують стадію розвитку зародків, відповідність стадії розвитку віку ембріона, стан бластомерів, прозорої оболонки та ін. Для мікрохірургічних робіт відбирають ембріони відмінної і хорошої якості, класифіковані як: пізні морули; ранні, що розширюються і пізні (розширені) бластоцисти. Такі ембріони мають ознаки (Інструкція з трансплантації ембріонів великої рогатої худоби, 1987):

- пізня морула відмінної якості – компактна структура, що складається з 32-64 щільно з'єднаних між собою клітин із розходженнями за величиною між бластомерами не більше 2:1. Характерні округлої форми, не зруйновані, без ознак лізису бластомери з зернистою цитоплазмою, неушкодженою прозорою оболонкою; відносно широкий перивителиновий простір не містить ізольованих бластомерів, гранул і включень. Діаметр прозорої оболонки – 140-170 мкм;

- пізня морула хорошої якості - допускається наявність гранул і включень у перивителлиновому просторі, поодиноких стиснутих бластомерів;

- пізні морули, що характеризуються значними порушеннями: дроблення частини бластомерів, великі розходження між бластомерами, стискування бластомерів, їхнє руйнування, порушення

зв'язків між бластомерами, невідповідність стадії розвитку віку ембріонів, ушкодження прозорої оболонки й ін., непридатні для мікроманіпуляцій;

- ранні бластоцисти відмінної якості складаються із > 64-130 рівномірно подрібнених клітин без ознак лізису, мають округлу форму, більш вузький, ніж у пізньої морули, перивителиновий простір, що не містить гранул, включень, поодиноких клітин, не ушкоджену прозору оболонку, що має таку ж товщину, яка властива прекомпактизованим ембріонам, помітний бластоціль, диференційовані клітини трофектодерми (ТЕ) і внутрішньої клітинної маси (ВКМ). Діаметр прозорої оболонки – 140-170 мкм;

- ранні бластоцисти хорошої якості можуть мати тонку прозору оболонку, нечітко виражений бластоціль, у перивителиновому просторі бувають гранули і включення, клітини трофектодерми можуть бути трохи стиснуті;

- бластоцисти, що розширюються, відмінної ї хорошої якості також складаються із > 64-130 клітин, мають товсту прозору оболонку, діаметр якої 140-200 мкм. Перивителиновий простір відсутній – витиснуто клітками трофектодерми, бластоціль великий, внутрішня клітинна маса локалізована на одному з полюсів ембріона, клітини ВМК і трофектодерми добре помітні – останні мають більш витягнуту форму;

- розширені (пізні) бластоцисти відмінної і хорошої якості складаються із > 130-200 клітин, прозора оболонка ембріонів розтягнута, тонка, порожнина збільшена, клітини ВМК і ТЕ добре виражені. Діаметр прозорої оболонки 180-220 мкм;

- бластоцисти, що характеризуються відсутністю вираженого бластоцілю, диференціюванням клітин ТЕ і ВМК, зруйнованими зв'язками між клітинами, руйнуванням клітин, тріщинами в прозорій оболонці, вибраковують через їхню непридатність для мікрохірургічних робіт.

Морфологічна оцінка ембріонів великої рогатої худоби в даний час є основним методом оцінки якості ембріонів перед їхньою трансплантацією. Цей спосіб не позбавлений суб'єктивності, у деяких випадках буває складно відрізнити, наприклад, пізню морулу від яйцеклітини та ін. Тому було розроблено інші методи оцінки повноцінності ембріонів. До них відносяться культивування зародків і зафарбовування клітин вітальними барвниками.

Культивування ембріонів *in vitro* дозволяє визначити здатність

зародків до подальшого розвитку. Однак культивування ембріонів протягом тривалого часу в будь-яких середовищах знижує їх життєздатність.

Методи вітального зафарбовування засновані на здатності барвників проникати через плазматичну мембрану живих або загиблих клітин. Основна вимога, що висувається до барвників – їх нетоксичність.

За розробки оптимальних умов одержання монозиготних близнюків велика увага приділялася тривалості культивування *in vitro* після поділу і трансплантації половинок ембріонів, а також їхньому збереженню в замороженому стані.

За попарних пересаджень половинок обидві половинки одного ембріона пересаджували реципієнтові в один ріг матки, що знаходиться на боці яєчника з жовтим тілом.

Дослідження показали відсутність достовірних розходжень у приживаності половинок відмінної і хорошої якості (якість половинок і їх приживаність не залежали від типу використаних мікрохірургічних інструментів), приживаність половинок задовільної якості різко знижувалася.

Однак, стадія розвитку ембріонів істотно впливала на результати пересадження половинок - приживаність поодиноких половинок бластоцист була істотно вище, ніж за поодиноких половинок морул. Попарне пересадження половинок морул і бластоцист сприяло зростанню частоти приживаності половинок.

Визначаючи якості половинок, слід враховувати розміри половинок, ступінь їхньої компактності і формування бластоцілю:

1. До відмінних половинок відносять рівні за розмірами частини ($1/2 + 1/2$) і половинки, що мають великі розміри ($2/3, 3/4$), що зовсім округлилися протягом 30-хвилинного культивування. За 3 години культивування такі половинки мали виражений бластоціль.

2. У хороших половинок також є бластоціль, але вони незначно відрізняються своїми розмірами ($< 1/2$) і мають ще не зовсім округлу форму.

3. Задовільні половинки значно відрізняються за своїми розмірами ($1/3, 1/4$), характеризуються слабовираженою компактністю і відсутністю бластоцілю.

4. Дегенеровані половинки не компактизуються, мають багато зруйнованих клітин, на вигляд пухкі через руйнування міжклітинних зв'язків між бластомерами.

Отримані дані свідчать, що порівняно з пересадженням цілих ембріонів, трансплантація свіжоотриманих половинок сприяє збільшенню кількості народжених телят на 40-60%. Методи розподілу, що використані, є простими, деякі з них не потребують дорогого обладнання (мікроманіпуляторів, мікрокузні) і тому можуть бути впроваджені на будь-яких пунктах трансплантації ембріонів як складовий елемент технології одержання і трансплантації ембріонів.

Для одержання четвертинок ембріонів компактизовані половинки поділяють ще раз на дві частини.

Після оцінки стану четвертинки ембріонів, визнаних придатними для подальшого розвитку, пересаджують до порожніх зон пелюциди. Для цього прозору оболонку фіксують мікроприсоскою із зовнішнім діаметром 100-150 мкм і внутрішнім – 30-40 мкм. Пересадження частин ембріонів всередину зони пелюциди проводять за допомогою ін'єкційної мікропіпетки через розріз, зроблений у зоні раніше. У дослідах використовують мікропіпетки із зовнішнім діаметром 65-75 мкм як із рівним, так і зі скошеним (загостреним) кінцем. Останнє значно полегшує проникнення цього інструмента всередину зони пелюциди. Поміщені у прозору оболонку четвертини ембріонів заряджають до контейнерів для пересадок і пересаджують реципієнтам.

Порожні зони пелюциди отримують заздалегідь з ооцитів великої рогатої худоби. Ооцити добувають із яєчників і очищують від клітин кумулюсу. Потім поміщають на предметне скло у краплю середовища Дюльбекко і фіксують мікроприсоскою. Мікроножем, зробленим із леза бритви, трохи надрізають зону пелюцида, 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.

За поділу пізньої морули або ранньої бластоцисти на 4 частини ембріони теж спочатку розділяють на дві половинки, кожна з яких культивують за температури 38,0°C у поживному середовищі 2-4 години, після чого кожен напівембріон поділяють на дві частини і культивують до формування бластоціля. Мікрохірургію ембріонів даних стадій розвитку краще проводити за кімнатної температури або в охолодженому розчині, тому що за температури середовища вище 20°C клітинні мембрани стають більш липкими, що утрудняє маніпуляції. У дослідах щодо чверті пізніх морул і ранніх

бластоцистів у процесі культивування *in vitro* компактизують і формують бластоціль з помітними клітинами трофктодерми і внутрішньої клітинної маси. Однак, їх приживаність була значно нижчою порівняно з половинками і цілими ембріонами.

Інший спосіб одержання бластоцист-чвертей великої рогатої худоби полягає у розподілі 4-клітинних ембріонів, отриманих *in vitro*, на окремі бластомери, поміщення їх у прозорі оболонки і наступного культивування до стадії бластоцисти. Від кожного з 73% 4-клітинних ембріонів було отримано 3-4 бластоцисти з кількістю клітин, у чотири рази меншою, ніж у звичайних бластоцист. У 1995 році вперше з'явилось повідомлення про одержання чотирьох монозиготних телят (після пересадження бластоцист-чвертей з ізольованих бластомерів 4-клітинного ембріона, отриманого *in vitro*).

Досліди показали, що з чвертей пізніх морул можуть утворюватися нормальні бластоцисти з числом клітин, у чотири рази меншим, ніж у звичайної бластоцисти. Ці бластоцисти можуть імплантуватися і розвиватися. Підтвердженням тому є народження двох живих теличок із чвертей однієї пізньої морули. Наступні досліди, однак, показали, що ембріони-чверті порівняно з цілими ембріонами і половинками, мають знижену приживаність, тому розподіл пізніх морул і ранніх бластоцист на 4 частини визнано недоцільним у комерційній діяльності. Очевидно, вироблення ранніх ембріональних факторів поодинокими чвертями недостатнє для запобігання лізису жовтого тіла реципієнтів. А кількість клітин трофктодерми і внутрішньої клітинної маси, що утворюється в таких ембріонах, не завжди забезпечує імплантацію і (або) формування позазародкових і ембріональних тканин плоду. До того ж, у процесі розподілу може відбуватися руйнування частини їх клітин. Збільшити частоту приживаності чвертей ембріонів великої рогатої худоби можна шляхом пересадження разом із чвертю свіжоотриманих трофобластичних пухирців.

Після розподілу пізніх морул і ранніх бластоцист на 2-4 частини з кожної частини ембріона формується бластоциста з числом клітин, удвічі або вчетверо меншим, ніж у звичайної бластоцисти. Успішна імплантація таких бластоцист завершується народженням нормальних нащадків. Дослідження, проведені на мишах, показали, що в зародках-половинках після імплантації на стадії гастрюляції відбувається прискорення проліферації клітин і до 10-ї доби вони досягають норми. Якщо ж агрегувати дві або більше морул миші, з

них сформується бластоциста, розміри якої значно більше розмірів звичайної бластоцисти. Проте, через 30-36 годин після імплантації в гігантських бластоцистах починається уповільнення темпів проліферації клітин і вже на стадії пізнього зародкового циліндра химерні ембріони за своїми розмірами не відрізняються від звичайних. Таким чином, постімплантовані ембріони мишей здатні дізнаватися про кількість клітин що відповідає гастрюляції і коректувати темп проліферації, нормалізуючи ріст і морфогенез. Очевидно, це стосується не тільки до мишей і великої рогатої худоби, а й усіх видів ссавців. Наприклад, трансплантація вівцям-реципієнтам реконструйованих бластоцист овець, що містять власну і чужу внутрішню клітинну масу, призвела до народження химерних ягнят; після пересадження половинок морул і бластоцист отримано монозиготних близнюків у свиней і кіз. Однак, здатність до регуляції маси клітин зародка не нескінченна і визначається певною граничною кількістю клітин. Значне зменшення їх кількості якщо і не перешкоджає здійсненню кавітації (від лат. *cavitatis* – заглиблення, порожнина – утворення пухирців), то і не призводить до формування нормальної бластоцисти, обмежуючись утворенням трофобластичних пухирців, нездатних до імплантації.

Як показали дослідження, наявність прозорої оболонки не є необхідною для подальшого розвитку половинок пізньої морули або бластоцисти. Значення прозорої оболонки для подальшого розвитку розподіленого ембріона зростає при трансплантації чверті ембріона. Оскільки напівембріони, поміщені в оболонку, легше ідентифікуються під мікроскопом, менше схильні прилипати до стінок піпетки або пайєти, можуть бути менше травмовані при трансплантації реципієнтам.

Прозора оболонка є складним біохімічним і антигенним комплексом позаклітинних глікопротеїнів, що оточують не тільки ооцити, а й доімплантаційні зародки. Прозора оболонка є потенційною імуноконтрацептивною 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.

У мишей прозора оболонка складається з трьох сульфатованих глікопротеїнів (ZP1, ZP2, ZP3), що розрізняються молекулярною

вагою та іншими властивостями. ZP3 має молекулярну вагу 83000 і є специфічним глікоротеїном для зв'язування сперматозоїдів. Ізольований ZP3 ефективно запобігає зв'язуванню сперматозоїдів з прозорою оболонкою і таким чином пригнічує запліднення у мишей. Якщо імунізувати мишей сироваткою проти прозорої оболонки, при цьому виникає безпліддя. Цей ефект зворотний і обумовлений запобіганням зв'язування сперміїв з прозорою оболонкою або її непроникистю для сперміїв. Найбільше у складі прозорої оболонки яйцеклітин мишей міститься сульфатованих глікопротеїнів з молекулярною вагою 140000 (ZP2). Цей глікопротеїн також змінюється після запліднення і, ймовірно, бере участь у блокаді поліспермії. Антитіла до ZP2 не заважають прикріпленню сперміїв до прозорої оболонки, але блокують запліднення, роблячи неможливою penetрацію прозорої оболонки.

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 обумовлена 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.

Основне значення прозорої оболонки зводиться до участі у заплідненні. За допомогою глікопротеїну ZP3 спермії зв'язуються з прозорою оболонкою, а після проникнення одного спермія в яйцеклітину цей глікопротеїн прозорої оболонки модифікується, і вона стає недоступною для інших сперміїв. У яйцеклітин з інтактною прозорою оболонкою блокада поліспермії розвивається за одну хвилину після запліднення.

Прозора оболонка зберігається протягом значної частини доімплантаційного розвитку зародків (кролі, вівці, свині). Завдяки прозорій оболонці бластомери зародка, що дробиться, розташовуються компактно і впорядковано, орієнтуючись в

обмеженому тривимірному просторі. Це має важливе значення для взаємодії бластомерів і створення між ними максимальної кількості контактів, що сприяє нормальній компактизації і поляризації бластомерів. Якщо видалити прозору оболонку у некомпактизованих зародків, то дроблення бластомерів буде продовжуватися, однак у багатьох випадках вони будуть розташовуватися у вигляді ланцюга, і компактизація повністю порушиться і буде дуже запізнюватися.

Прозора оболонка перешкоджає випадковому злипанню сусідніх зародків (бластомери доімплантаційних зародків мають підвищену здатність до злипання), а також прилипання зародків до стінки яйцепроводу і матки, яке викликає загибель ранніх зародків. Тому при роботі *in vitro* з ранніми зародками з віддаленою прозорою оболонкою їх або поміщають в інші прозорі оболонки (наприклад, незрілих або дозрілих ооцитів), або використовують штучні оболонки, наприклад, з агару або желатину.

Важливу роль прозорої оболонки зазначено в досліджах, що продемонстрували можливість кріоконсервування половинок 7-денних ембріонів великої рогатої худоби. Половинки пізніх морул або бластоцист великої рогатої худоби, кріоконсервованих без оболонки, були непридатні для пересадження. Пересадження заморожено-відтаяних половинок відмінної і хорошої якості, що були в одній оболонці, індукувало тільність у 25,0% реципієнтів. Переміщення ж половинок до додаткової прозорої оболонки бластоцист, що вилупилися, отриманих у свині, призвело до тільності 46,2% реципієнтів. Таким чином, переміщення напівембріонів у додаткову оболонку є ефективним методом збереження їхньої життєздатності при кріоконсервуванні.

Для пересадження половинок і чвертей до прозорих оболонок, використовують оболонки свіжоотриманих дегенерованих зародків або незапліднених яйцеклітин, а також оболонки статевих клітин і зародків, що зберігаються в 2,0 М розчині сахарози за температури – 20°C.

Половинки і чверті ембріонів великої рогатої худоби пересаджують реципієнтам після нетривалого культивування, протягом якого вони компактизуються – набувають кулястої форми.

Застосовують різні способи нехірургічної трансплантації половинок ембріонів реципієнтам, синхронізованим за статевим циклом зі стадіями розвитку напівембріонів: по одній половинці пересаджують кожному реципієнтові в ріг матки; обидві половинки

трансплантують одному реципієнтові в ріг матки зі сторони яєчника з жовтим тілом; дві половинки пересаджують одному реципієнтові в різні роги матки.

Двійні, що розвиваються в одному розі, можуть призводити до ускладнення отелень і високої смертності монозиготних близнюків. З метою підвищення приживаності половинки в один ріг матки можна пересадити як половинку, так і нерозподілену бластоцисту умовно-придатної якості з життєздатними клітинами трофектодерми, що обумовить підвищену інтенсивність ембріональних сигналів матці реципієнта на продовження функцій жовтого тіла статевого циклу і перетворення його на жовте тіло вагітності.

Установлено, що тривалість культивування половинок ембріонів більше 4-х год. знижує результативність їх наступної приживаності. Культивування *in vitro* половинок ембріонів великої рогатої худоби протягом 24-х год. знижує їх приживаність приблизно в три рази порівняно з культивуванням *in vitro* протягом 4-6 год.

За даними Дж. Хан і Т. Розеліуса, розподіленню ембріонів суттєво не впливало на їх життєздатність. Якщо за пересадження цілих ембріонів одержано 63,5% тільності реципієнтів, то за трансплантації половинок – 58%. Тепер широко практикують розділення на половинки і четвертинки розморожених ембріонів.

Теоретично можливо розділити ембріони на досить велику кількість частин, і створити мікроклон, тим самим різко збільшити кількість нащадків. Проте, як зазначають Л.К. Ернст і А.К. Голубев, найперспективнішим шляхом є використання культури клітин. Якби вдалося культивувати окремо клітини ембріобласта і трофобласта без втрати їх специфічності, то потім створені ембріони (шляхом з'єднання клітин ембріобласта і трофобласта з клітинною культурою) давали б необмежені кількості однакових за генотипом нащадків (стандартних тварин). Але слід враховувати, що тут, як і за одержання монозиготних двійнят, відбувається копіювання генотипу, невідомого щодо продуктивних якостей організму. Це є основним недоліком зазначеного методу. Необхідно також враховувати, що за допомогою розглянутих методів поки що не вдалося одержати великої кількості ідентичних нащадків. Розподіл ембріона на велику кількість частин знижує їх здатність до розвитку. Однояйцеві близнюки не є абсолютними, зокрема фенотиповими копіями один одного. Так, у розподілених половинок 2-бластомерного ембріона миші була різна швидкість дроблення, а одержані таким способом

ягнята-близнюки мали відмінності у пігментації вовни. Це також спостерігали у телят.

4. Створення химерних тварин.

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 химерізм, 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 химерізм (Завертяєв Б.П., 1987). Варто відрізнити 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.

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. Схематично ці методи показано на рис. 65.

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

Два ембріони, що розрізняються генотипами на стадії 8-12 бластомерів, обробляють протеолітичним ферментом проназою,

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

Ін'єкційний метод. Ін'єкційний метод, що потребує застосування мікроманіпуляційної техніки й мікрохірургічного втручання, був розроблений Р. Гарднером (1968). За ін'єкційного методу використовують ембріони, що перебувають на стадії бластоцисти. Бластоцисту тримають усмоктувальною піпеткою й, використовуючи мікроманіпулятори, у трофобласті шляхом проколів голками зони пелюциду роблять отвір, через який ін'єктують ВКМ донорського зародка. Пізніше вдалося встановити, що за цим методом можливо ін'єктувати не тільки ВКМ ранніх ембріонів, а й більш диференційовані клітини. Отриману химерну бластоцисту трансплантують миші-реципієнтови.

Ін'єкційний метод знайшов застосування за одержання міжвидових химер.

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

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 B., 1965), Надалі було показано, що в експериментальних химер, отриманих з пігментованої і

непігментованої лінії, 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. На підставі цих даних з'ясовано, що, наприклад, багато генів які раніше «мовчали» у ракових клітинах, експресуються не тільки в онтогенезі миші, а й у її потомства. Отже, виникнення злоякісних новоутворень може бути обумовлено зміною експресії нормального клітинного генома і не слід розглядати мутації як єдину причину малігнізації.

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 господарсько-важливі ознаки.

Уперше міжвидові химери були отримані ін'єкційними і агрегаційними методами між двома близькими видами мишей, які звичайно не схрещуються – *M. musculus* і *M. castor*. У міжвидових

химер, отриманих шляхом ін'єкції ВКМ *M. caroli* у бластоцисти *M. musculus* і пересаджених реципієнтам останнього виду, не виявили імуногенетичної несумісності клітин, і їхній розвиток відбувався нормально. Якщо ж міжвидові химери одержували реципрокною ін'єкцією і розвиток зародків відбувався в організмі *M. musculus*, то химери гинули протягом 16 діб після пересадки. Це свідчить про те, що бластоцисти *M. caroli* дегенерують у матці *M. musculus*, в той час як агрегація двох генетично різних зародків забезпечує життєздатність химер.

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

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 бластоциль 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 химеризм 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 досліді S. Meinecke-Tillman і В. Meinecke були отримані лише агрегаційні химери. Агрегація зародків відбувалася на стадії 8-12 бластомерів. Химерні бластоцисти пересаджували в матку вівці. З 15 трансплантованих ембріонів народилося два ягняти і одне цапеня, але аналіз крові не виявив химеризму. Однак, як і в першому досліді, вівця була здатною виносити цапеня. За припущенням авторів, відсутність імунологічної реакції обумовлено наявністю в плаценті агрегованого зародка клітин овечого генотипу.

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 рамбульє 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-реципієнтові 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 бичок 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 господарсько-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 можлив закріпити в наступному поколінні.

Важливою особливістю химерних ембріонів є те, що вони підтримують життєздатність клітин зародків летальних генотипів. Наприклад, химери, отримані від нормальних і нежиттєздатних зародків-трисомиків за хромосомами 17, 15 і 12, нормально розвивалися і давали потомство, що не має трисомиків. Химерні ембріони становлять великий інтерес для вивчення можливості розробки методів клонування дорослих тварин шляхом партеногенезу. Доведено, що пересадження мишам і великій рогатій худобі химерних ембріонів, які складаються з клітин звичайних (отриманих у результаті запліднення) і диплоїдних гомозиготних гіногенетичних зародків, призвело до народження живого потомства, органи і тканини якого походили як від звичайних, так і партеногенетичних бластомерів. Наступні експерименти підтвердили участь партеногенетичних клітин химерних зародків миші в розвитку ембріона. Отже, для завершення ембріонального розвитку наявність материнських і батьківських хромосом у кожному бластомері не обов'язкова. Для завершення ембріогенезу і народження химерного потомства миші може бути достатньою одна клітина 8-бластомерного звичайного ембріона, агрегованого з 4-бластомерним партеногеноном. Дослідження тканин химерних мишей показало, що всі клітини, що створилися від гаплоїдних партеногенонів, мали диплоїдний набір хромосом. Гаплоїдного набору не достатньо для проліферації клітин, тому виживають лише диплоїдизовані клітини. Виходячи з вищевикладеного, робимо висновок, що клонування тварин-донорів ооцитів шляхом трансплантації реципієнтам химерних зародків, які складаються з клітин звичайних і амейотичних партеногенетичних ембріонів становить великий інтерес. Такий химерний ембріон може бути отриманий методами мікрomanipуляцій шляхом заміни клітин ВКМ звичайної бластоцисти на ВКМ бластоцисти партеногенетичного походження, тобто химерна бластоциста буде складатися з клітин ТЕ звичайної бластоцисти і ВКМ бластоцисти-партеногенона. Наявність батьківських хромосом у трофектодермі химерної бластоцисти, ймовірно, забезпечить імплантацію і формування позазародкових тканин, а можливо, і розвиток ембріона з генотипом партеногенона.

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.

У даний час обговорюються можливості використання химерних ембріонів за розробки нових підходів до клонування зародків з використанням ембріональних стовбурових клітин (ЕСК). Так, для мишей показана принципова можливість одержання живих нащадків, що повністю утворюються з ЕСК, шляхом введення 12-15 ЕСК у порожнину бластоцист із вилученої власної ВКМ. Однак, ці мишенята відрізнялися зниженою життєздатністю і загинули незабаром після народження.

Нові можливості в селекції тварин відкриваються з використанням у дослідах за одержання трансгенних тварин бластоцист, у порожнину яких ін'єктовано генетично трансформовані ембріональні стовбурові клітини. Пересадження таких химерних бластоцист може призвести до народження химерних тварин, у яких частина клітин різних органів, у тому числі гонад, буде походити від ембріональних стовбурних клітин. В останньому випадку частина потомства може виявитися трансгенною. Вважається, що такий метод одержання трансгенних тварин є більш ефективним, ніж ін'єкція ДНК (чужорідної ДНК) у чоловічий пронуклеус, тому що дозволяє оцінити трансформацію генома ЕСК до їх введення в ембріон.

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

Література

1. Генетика, селекція і біотехнологія в скотіводстві / [М. В. Зубец, В. П. Буркат, Ю. Ф. Мельник і др.]; під ред. М. В. Зубца. – К. : БМТ, 1997. – 722 с.
2. Герасименко В. Г. Біотехнологія / В. Г. Герасименко. – К. : Вища шк., 1989. – 343 с.
3. Завертяев В. П. Біотехнологія в виробництві і селекції великого рогатого скота / В. П. Завертяев. – Л. : Агропромиздат, 1989. – 255 с.
4. Квасницький А. В. Трансплантація ембріонів і генетична інженерія в твариніводстві / А. В. Квасницький, Н. А. Мартиненко, А. Г. Близнюченко. – К. : Урожай, 1988. – 260 с.
5. Коваленко В. П. Біотехнологія у твариніводстві й генетиці / В. П. Коваленко, І. Ю. Горбатенко. – К. : Урожай, 1992. – 150 с.
6. Осташко Ф. І. Біотехнологія виробництва великого рогатого скота / Ф. І. Осташко. – К. : Аграрна наука, 1995. – 183 с.
7. Юлевич О. І. Біотехнологія : навчальний посібник / О. І. Юлевич, С. І. Ковтун, М. І. Гиль ; за ред. М. І. Гиль. – Миколаїв : МДАУ, 2012. – 476 с.
8. Яблонський В. А. Трансплантація ембріонів у сільськогосподарських тварин / В. А. Яблонський. – Кишинів, 1988. – 96 с.
9. Яблонський В. А. Біотехнологічні і молекулярно-генетичні основи відтворення тварин / В. А. Яблонський. – Львів : Афіша, 2009. – 217 с.
10. Яблонський В. А. Біотехнологія відтворення тварин / В. А. Яблонський. – К. : Арістей, 2005. – 293 с.
11. Яблонський В. А. Практичне акушерство, гінекологія та біотехнологія відтворення тварин з основами андрології / В. А. Яблонський. – К. : Мета, 2002. – 317 с.
12. Яблонський В. А. Практичне акушерство, гінекологія та штучне осіменіння сільськогосподарських тварин / В. А. Яблонський – К. : Урожай, 1995. – 286 с.

Навчальне видання

Мельник Володимир Олександрович
Кот Стах Петрович
Кравченко Олена Олександрівна

БІОТЕХНОЛОГІЯ РЕПРОДУКЦІЇ ОРГАНІЗМІВ

Конспект лекцій

Відповідальний за випуск: С. П. Кот

Формат 60×84 1/16 Ум. друк. арк. 6,5

Тираж 30 прим. Зам № _____

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.

