

Інститут розведення і генетики тварин УААН

На правах рукопису

ЄЛІЗАРОВА ІРИНА БОРИСІВНА

УДК 636. 2. 082. 454 + 581. 16: 612. 613

"ЦИТОГЕНЕТИЧНІ АСПЕКТИ ЗАПЛІДНЕННЯ IN VITRO
ООЦИТІВ КОРІВ І ГЕТЕРОЛОГІЧНОЇ ПЕНЕТРАЦІЇ
ЯЙЦЕКЛІТИН ЗОЛОТИСТОГО ХОМ'ЯЧКА"

Спеціальність 03. 00. 15-Генетика

Автореферат дисертації на здобуття наукового
ступеня кандидата біологічних наук

Київ-1995

АВ 32.362

Робота виконана в лабораторії клітинної інженерії Інституту розведення і генетики тварин УААН.

Наукові керівники: доктор сільськогосподарських наук, академік УААН
ЗУВЕЦЬ Михайло Васильович,
кандидат біологічних наук,
КУЗНЕЦОВ Валерій Євгенович

Офіційні опоненти: доктор біологічних наук, професор
КОНОВАЛОВ Вячеслав Сергійович,
кандидат біологічних наук,
БЕРДИЧЕВСЬКИЙ Микола Степанович

Провідна організація - Інститут тваринництва УААН.

Захист відбудеться "30" травня 1995 р.
о 10 годині на засіданні спеціалізованої вченої ради
Інституту розведення і генетики тварин УААН за адресою:
256319, Україна, Київська обл., Бориспільський район,
с. Чубинське, вул. Погребняка, 1.

З дисертацією можна ознайомитись у бібліотеці Інституту розведення і генетики тварин УААН.

Автореферат розісланий "27" квітня 1995 р.

Вчений секретар
спеціалізованої вченої Ради,
кандидат біологічних наук

М. Ф. Павліченко

ЛНБ ім. В. Стефанишина
АН України

ЛНБ України ім. В. Стефанишина
00754902 (R)



1. ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

1.1. Актуальність теми. Фундаментальні дослідження в галузі біології розвитку відкривають великі перспективи її використання в тваринництві. В останні роки все більш поширене застосування у відтворенні знаходить метод одержання ембріонів великої рогатої худоби з ооцитів корів, які дозріли *in vitro* та були запліднені поза організмом /Reichenbach e. a., 1992; Mermillod e. a., 1993; Kruip & Boni, 1994 та ін./ Дослідження по дозріванню і заплідненню ооцитів поза організмом можуть служити базою для розробки і впровадження методів клітинної і генетичної інженерії в тваринництві /Greve, 1992; Techakumphu e. a., 1993; Neuman e. a., 1994; Keefer e. a., 1994/, вивченню можливості більш об'єктивної оцінки запліднюючої здатності сперматозоїдів сільськогосподарських тварин на основі моделювання процесів взаємодії чоловічих і жіночих гамет в умовах *in vitro*. /Eaglesome & Miller, 1989; Le Guienne e. a., 1990; Le Guienne & Humblot, 1991; Fazeli e. a., 1993; Barandi e. a., 1993/.

Поряд з тим, аналіз літературних даних показує, що багато які аспекти одержання *in vitro* ембріонів великої рогатої худоби залишаються нез'ясованими. До їх числа можна віднести адекватність умов культивування ооцитів і ембріонів різних стадій умовам їх розвитку *in vivo*, підготовку сперматозоїдів до запліднення поза організмом, запліднення яйцеклітин *in vitro* та ін. В результаті цього частота запліднення ооцитів, які дозріли поза організмом, залишається на недостатньо високому рівні, лише невелика кількість ембріонів розвивається *in vitro* до стадій морули-бластоцисти, при досягненні яких можлива нехірургічна трансплантація, відсутні

добре відтворювані результати; компактизовані ембріони, отримані *in vitro*, є більш чутливими до заморожування-розморожування, в порівнянні із ембріонами, вимитими з рогів матки.

1.2. Мета і завдання досліджень. Метою роботи були розробка методу оцінки запліднюючої здатності сперматозоїдів бугаїв *in vitro* за допомогою гетеро- і гомологічної пенетрації та вивчення цитоморфологічних характеристик ембріонів великої рогатої худоби, отриманих *in vitro*.

Виходячи з поставленої мети, вирішувались такі завдання:

- визначити морфофункціональні критерії оцінки капацизації сперматозоїдів бугаїв в умовах *in vitro*;

- показати можливість використання гетеро- і гомологічного тестів для оцінки запліднюючої здатності сперматозоїдів бугаїв *in vitro*;

- показати можливість одержання прометафазних і метафазних хромосом сперматозоїдів бугаїв з використанням гетерологічної пенетрації яйцеклітин хом'ячка;

- вияснити вплив методів одержання ооцит-кумулясних комплексів на дозрівання і запліднення ооцитів корів *in vitro*;

- дослідити вплив еструсної сироватки крові корів на дозрівання і запліднення ооцитів корів *in vitro*;

- вивчити вплив часткового видалення клітин кумулюса та мікрохірургічного розсічення ділянки прозорої оболонки ооцитів корів на їх запліднення і розвиток зигот поза організмом;

- подолання блоку дроблення ембріонів великої рогатої худоби *in vitro* та їх розвиток до стадії бластоцисти.

1.3. Наукова новизна роботи. В результаті проведеної ро-

боти вперше продемонстрована можливість візуальної оцінки готовності капацитованих за допомогою гепарину сперматозоїдів бугаїв до запліднення *in vitro*.

Вперше запропонована комплексна оцінка запліднюючої здатності сперматозоїдів бугаїв *in vitro* за допомогою гетеро- і гомологічного тестів на penetрацію яйцеклітин.

Показана можливість одержання прометафазних і метафазних хромосом сперматозоїдів бугаїв.

Відмічено, що спосіб видалення ооцитів не впливає на частоту дозрівання і запліднення яйцеклітин *in vitro*, але впливає на кількість інтактних ооцит-кумулясних комплексів, які можна здобути з одного яєчника.

Показано позитивний вплив еструсної сироватки крові корів на дозрівання і запліднення ооцитів корів поза організмом.

Установлена залежність здатності зигот до формування раних ембріонів, які дробляться, від цілісності ооцит-кумулясних комплексів при заплідненні ооцитів корів *in vitro*.

Вперше показана можливість нормального запліднення і подальшого розвитку ооцитів корів із частково розсіченою проворою оболонкою.

Виявлено, що росташування запліднених *in vitro* яйцеклітин корів на моношарі епітеліальних клітин яйцепроводів корів та у кондиційованому на моношарі середовищі сприяє розвитку зигот до пізньої морули і бластоцисти, показана залежність ефективності використання моношару епітеліальних клітин яйцепроводів від стадії статевого циклу корів.

Виявлена залежність між стадією розвитку раних ембріонів, які дробляться, і їх здатністю до розвитку *in vitro* до

стадії бластоцисти.

1.4. Практична значимість. Розроблено спосіб комплексної оцінки запліднюючої здатності сперматозоїдів бугаїв в умовах *in vitro* для дослідів по одержанню ембріонів великої рогатої худоби поза організмом, який може бути використаний при відборі бугаїв для штучного осіменіння. Показана можливість одержання морул і бластоцист великої рогатої худоби з яйцеклітин корів, які дозріли та були запліднені *in vitro*.

1.5. Реалізація результатів досліджень. В Головному селекційному центрі (м. Переяслав-Хмельницький) здійснено пересаджування бластоцист великої рогатої худоби, отриманих *in vitro*.

1.6. Положення, які виносяться на захист:

- обґрунтування доцільності оцінки запліднюючої здатності сперматозоїдів бугаїв в умовах *in vitro* за допомогою комплексного тесту на гетеро- і гомологічну пенетрацію;

- значення методу часткового розвічення проворі оболонки ооцитів корів в дослідях по одержанню ембріонів поза організмом при використанні сім'я зі зниженою концентрацією сперматозоїдів;

- обґрунтування необхідності культивування одноклітинних ембріонів великої рогатої худоби на моношарі епітеліальних клітин яйцепроводів корів, яечник яких містить новоутворене жовте тіло і у кондиційованому на цьому моношарі середовищі.

1.7. Апробація роботи. Результати досліджень викладені в доповідях на Республіканській науковій конференції "Состояние и перспективы развития биотехнологии в животноводстве" (Харків, 1988), на II Республіканській науково-виробничій конференції "О мерах по повышению эффективности и улучшению

організації більш широкого використання біотехнології в племенному животноводстві" (Львів, 1988), на науково-методичній нараді "Трансплантація ембріонів крупного рогатого скота" (Жодино, 1989), на Всесоюзній науково-технічній нараді "Проблеми розвитку біотехнології в животноводстві" (Дубровиці, 1990), на конференції (науковій дискусії) "Новое в породообразовательном процессе" (с. Чубинское, 1993), на науково-практичній конференції "Генетико-селекційні та технологічні проблеми відтворення с.-г. тварин" (Київ, 1994), на Всеукраїнській ювілейній науково-практичній конференції "Генетика продуктивності тварин" (Київ, 1994).

1.8. Публікація результатів досліджень. По матеріалах дисертації опубліковано 12 друкованих праць.

1.9. Особиста участь дисертанта в проведенні досліджень. Особиста участь І.В. Єлізарової в одержанні наукових результатів, викладених в дисертації, полягає в зборі матеріалу за тривалий період, обробці і аналізі одержаних даних. Дисертант приймала участь в проведенні досліджень в лабораторії клітинної інженерії Інституту розведення і генетики тварин та Харковплемсервісі і Прилукському племпідприємстві.

1.10. Об'єм і структура дисертації. Дисертація викладена на 157 сторінках машинописного тексту і містить 14 таблиць і 28 малюнків. Робота складається з вступу, огляду літератури, матеріалу і методики досліджень, результатів власних досліджень та їх обговорення, висновків і практичних пропозицій, список літератури містить 185 джерел, з них 157 іноземних.

2. МАТЕРІАЛ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

Капацітацію заморожено-розморожених сперматозоїдів бугаїв викликали за допомогою гепарину (200 ОД/мл, 15 хвилин).

Суперовуляцію у статевозрілих самок золотистого хом'ячка (*Mesocricetus auratus*) викликали шляхом ін'єкції ГСЖК та ЛХГ. Спільну інкубацію звільнених від проворої оболонки яйцеклітин із сперматозоїдами бугая здійснювали на протязі 5 годин. Для одержання препаратів метафазних хромосом сперматозоїдів бугая в середовище культивування яйцеклітин хом'ячка додавали 0,5 мкг/мл колцеміду.

Ооцити здобували з яєчників забитих корів і телиць і культивували в середовищі 199, яке містило 20% інактивованої фетальної сироватки теляти, 0,5 мкг/мл ФСГ, 6 ОД/мл ЛХГ, 1 мкг/мл естрадіолу-17 В та антибіотики, на протязі 24 годин при +38,5°C. Спільну інкубацію ооцитів корів із сперматозоїдами бугая ($1,5 - 2,0 \cdot 10^6$ Сп/мл) здійснювали на протязі 18 годин. Після осіменіння яйцеклітини культивували *in vitro* на протязі 24 годин. Для одержання препаратів метафазних хромосом ембріонів великої рогатої худоби, одержаних пова організмом, в середовище культивування додавали 0,05 мкг/мл колцеміду (тривалість експозиції - 5 годин).

Частину ооцитів корів, які дозріли *in vitro*, зберігали у 1,5 М хлориді магнію при +5°C протягом 1-21 доби. Після інкубації із сперматозоїдами бугая ооцити досліджували під фазово-контрастним мікроскопом на наявність пенетрації.

Мікроголку і тримаючу мікропіпетку виготовляли з скла "пірекс" на мікрокузні типу "МК" /Кузнецов, 1991/. Після часткового розвічення проворої оболонки (ЧРО) у 0,5 М розчині цукрови ооцити інкубували із сперматозоїдами бугая (10^6 Сп/мл) на протязі 12 годин, відмивали від сперміїв і культивували *in vitro* протягом 24 годин.

З метою подолання блоку дроблення ембріонів великої ро-

гатої худоби *in vitro* запліднені поза організмом інтактні яйцеклітини корів культивували протягом 184 годин на моношарі епітеліальних клітин яйцепроводів корів або в кондиціонованому середовищі. Стадії розвитку ембріонів аналізували через 90 годин після запліднення.

Для дослідження перетворень хроматину ооцитів і ембріонів готували сухоповітряні препарати за методом Тарковського /Tarkowski, 1966/, які фарбували розчином барвника Гімза.

З метою порівняння цитоморфологічних характеристик морул і бластоцист, одержаних *in vitro* і *in vivo*, здійснювали нехірургічне вимивання ембріонів із рогів матки гормонально оброблених корів-донорів на 6 і 7 день після осіменіння.

Матеріал документували мікрофотографіями. Статистичну обробку одержаних даних проводили з використанням критеріїв Ст'юдента та Хі-квадрат /Лакин, 1990/.

3. РЕЗУЛЬТАТИ ВЛАСНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

3.1. Оцінка запліднюючої здатності сперматозоїдів бугаїв в умовах взаємодії гамет *in vitro*

Як виявили наші дослідження, кількість повноцінних яйцеклітин золотистого ком'ячка, отриманих в результаті суперовуляції, залежить від стадії статевого циклу, на якій уводиться ГСЖК, а також від часу наступного уведення ЛХГ. Найбільша кількість яйцеклітин була одержана після ін'єкції ГСЖК на стадії метеструс I і наступного уведення ЛХГ через 56 годин (табл. 1). При ін'єкції ЛХГ через 48 і 72 години кількість яйцеклітин вірогідно зменшувалась. Цитогенетичний аналіз препаратів яйцеклітин ком'ячків показав, що при суперовуляції у самок поряд з нормальною овуляцією клітин на стадії метафази II мейозу спостерігається передчасний вихід

Таблиця 1

Якість ооцитів золотистого хом'ячка, одержаних після суперовуляції, викликаній в різні стадії естрального циклу (введення ЛХГ через 56 годин після ін'єкції ГСЖК)

Стадії естрального циклу	Кількість досліджених тварин	Всього ооцитів	Кількість ооцитів, $M \pm m$			
			в нормальній овуляцією на МІІ мейозу	в овуляцією на стадії ІІ мейозу	з 1 або 2 партеногенетичними пронуклеусами	з хромосомними порушеннями
Метеструс I	17	696	$38,3 \pm 1,85^{\wedge}$ (95,3%)	$1,9 \pm 0,22$ (4,7%)	-	$4,5 \pm 0,47^{\wedge\wedge}$ (10,9%)
Метеструс II	17	369	$18,9 \pm 2,05$ (85,9%)	$2,8 \pm 0,32$ (12,7%)	$0,3 \pm 0,11$ (1,4%)	$13,4 \pm 0,79$ (61,8%)
Діеструс	10	76	$6,2 \pm 1,47^{\wedge\wedge}$ (81,6%)	$0,8 \pm 0,2$ (10,5%)	$0,6 \pm 0,22$ (7,9%)	$4,4 \pm 0,54$ (57,9%)
Проеструс	9	93	$8,0 \pm 0,76$ (77,4%)	$2,1 \pm 0,51$ (20,4%)	$0,2 \pm 0,15$ (2,2%)	$3,2 \pm 0,52$ (31,2%)
Контроль (спонтанна овуляція)	12	101	$9,1 \pm 0,51$ (100%)	-	-	$0,7 \pm 0,22$ (7,9%)

\wedge - $P < 0,001$ в порівнянні із метеструсом II;

$\wedge\wedge$ - $P > 0,05$ в порівнянні із контролем,

$\wedge\wedge\wedge$ - $P < 0,001$ в порівнянні із метеструсом II

яйцеклітин в яйцепроводи, а також стимуляція яйцеклітин до партеногенетичного розвитку.

Досліди показали, що капцитовані *in vitro* за допомогою гепарину сперматозоїди бугая здатні до пенетрації плазматичної мембрани звільнених від проворої оболонки яйцеклітин хом'ячка - інкубація яйцеклітин хом'ячка із сперматозоїдами бугая протягом 5 годин приводила до пенетрації 78,5% (n = 571) жіночих гамет. На цей час у більшості яйцеклітин була відмічена наявність розбухлої голівки сперматозоїда з хвостом (60,6%), решта яйцеклітин містила чоловічі пронуклеуси з хвостами або сперматозоїди без ознак деконденсації хроматину. У 48,5% пенетрованих яйцеклітин мала місце поліспермія. Подальше культивування *in vitro* осіменених яйцеклітин (n = 114) протягом 16 годин дозволило отримати прометафазні хромосоми сперматозоїдів бугая у 46,5% яйцеклітин. Додавання в середовище культивування яйцеклітин (n = 230) колцеміду на заключному етапі, при загальній тривалості культивування 24 години, дозволило одержати конденсовані метафазні хромосоми сперматозоїдів бугая в 25,7% яйцеклітин.

Удосконалення методів одержання ембріонів великої рогатої худоби *in vitro* підвищує вимоги до ефективності капцитациі і оцінки запліднючої здатності сперматозоїдів бугаїв поза організмом. Нами проводились дослідження по визначенню ефективності оцінки запліднючої здатності сперматозоїдів бугаїв Політ 340Б і Мамонт 4719 за допомогою гетеро- і гомологічного тестів, при цьому характеристики сперми обох бугаїв після розморожування були подібними. Крім тесту на пенетрацію оолеми яйцеклітин хом'ячка, ми використовували розроблений нами спосіб оцінки здатності сперматозоїдів до пенет-

рації проворої оболонки яйцеклітин корів, які довели *in vitro* і зберігались у сольовому розчині 1,5 М хлориду магнію. Оцінка показників запліднюючої здатності бугаїв за допомогою гетерологічного тесту показала відсутність вірогідної різниці за частотою penetрації яйцеклітин золотистого хом'ячка сперматозоїдами обох бугаїв, проте, була одержана різниця між бугаями при penetрації гомологічної проворої оболонки ооцитів, які зберігались у сольовому розчині (табл. 2).

Таблиця 2

Порівняння запліднюючої здатності сперматозоїдів двох бугаїв поза організмом

Бугаї	Гетерологічна penetрація		Гомологічна penetрація		Гомологічне запліднення		
	кількість осіменених яйцеклітин	% penetрації ооцити	кількість осіменених ооцитів	% penetрації прозорі оболонки	кількість осіменених ооцитів	% запліднення	% дроблення

Політ 3405 198 74,2* 121 62,0** 162 45,7*** 19,8****

Мамонт 4719 186 65,6* 137 37,2** 186 28,0*** 9,7****

* - $P > 0,05$

** - $P < 0,001$

*** - $P < 0,001$

**** - $P < 0,05$

В дослідах по заплідненню *in vitro* інтактних ооцитів корів була виявлена різниця між бугаями за частотою запліднення і дроблення ооцитів, що відповідає різниці за частотою penetрації гомологічної проворої оболонки.

На наш погляд, гетерологічна penetрація може бути використана як тест запліднюючої здатності сперматозоїдів бугаїв

в тих випадках, коли низька запліднююча здатність зв'язана із неадекватністю сперматозоїдів до проходження капацитації і акросомної реакції та злиття з оолемою яйцеклітини; цей метод дозволяє також оцінити здатність сперматозоїдів бугаїв до деконденсації хроматину в ооплазмі яйцеклітин з формуванням чоловічих пронуклеусів. Осіменіння яйцеклітин корів, які дозріли *in vitro* і зберігались в сольовому розчині, капацитованими сперматозоїдами бугая дає можливість без будь-якого забарвлення вивчати здатність сперматозоїдів різних бугаїв до пенетрації прозорої оболонки і не потребує культивування яйцеклітин після запліднення, при цьому сперматозоїди бугаїв не проникали в ооплазму таких ооцитів. Тому ми вважаємо, що тільки комплексний метод, який базується на використанні тестів на гетеро- і гомологічну пенетрацію, може дозволити вірогідніше оцінити запліднюючу здатність сперматозоїдів бугаїв в умовах *in vitro* і може знайти застосування для відбору бугаїв для дослідів по одержанню ембріонів великої рогатої худоби поза організмом.

3.2. Запліднення *in vitro* ооцитів корів, які дозріли поза організмом

Істотне значення при добуванні ооцитів з яєчників має кількість видалених ооцитів, збереження цілісності ооцит-кумулясних комплексів, тривалість видалення і відбору ооцитів і час контакту жіночих статевих клітин з продуктами розриву тканин яєчника, які негативно впливають на життєздатність ооцитів і їх здатність до подальшого запліднення *in vitro*.

При аспірації і розриванні фолікулів яєчників подібних розмірів нами було отримано $8,5 \pm 0,43$ і $16,2 \pm 0,57$ ооцитів на один яєчник, відповідно. Час, витрачений на одержання,

пошук, відбір і відмивання ооцитів з чотирьох яєчників при аспірації і розсіченні, складав близько 20 і 40 хвилин, відповідно. Обидва способи виділення ооцитів не впливали на цілісність і структуру ОКК і збереження цільного і компактного кумулюса. Дозрівання і запліднення ооцитів *in vitro* показало, що спосіб добування ооцитів не впливає на частоту дозрівання і рівень хромосомних порушень ооцитів, відсоток запліднення і дроблення яйцеклітин (табл. 3, $P > 0,05$), тому розсічення фолікулів дозволяє отримати більшу кількість ембріонів з одного яєчника.

Таблиця 3

Дозрівання і запліднення поза організмом ооцитів корів, видалених з яєчників різними методами

Спосіб видалення ооцитів	К і л ь к і с ь					
	морфоло- гічно нормаль- них ооцитів на яєчник, M+m	ооцитів на метафазі II у т.ч. із хро- мосом- ними пору- шення- ми, а(%)	ооци- тів, мене- ніх ооци- тів, а	зап- лід- нених ооци- тів, %	ембрі- онів ранніх стадій дроб- лення, %	
Аспірація 2I	8,5±0,43*	35(87,5)	1(2,9)	144	34,7	19,4
Розсічення I7	16,2±0,57*	52(86,7)	2(3,8)	224	37,5	22,3

* - $P < 0,001$

Відомо, що наявність оточуючих ооцит клітин кумулюса впливає на ефективність запліднення *in vitro* /Fukui, 1990/. Нами вивчався вплив цілісності ооцит-кумулюсних комплексів (ОКК) корів на запліднення і подальший розвиток яйцеклітин *in vitro*. Досліди показали, що частота формування чоловічого і жіночого пронуклеусів у ооцитів, оточених клітинами ку-

мулюса (n = 187), та у ооцитів, частково звільнених від кумулюса (n = 176), вірогідно не відрізнялась - 41,7 та 37,5%, відповідно; але відсоток дроблення яйцеклітин, оточених інтактним розпушеним кумулюсом, був вірогідно вищим (27,3%), ніж у ооцитів з частково видаленим кумулюсом (17,6%).

В досліджах по дозріванню ооцитів корів *in vitro* найбільш часто використовують два типи сироваток - фетальну сироватку теляти /Galli & Lazzari, 1994/ і еструсну сироватку крові корів /Jura e. a., 1994/. Викликає інтерес порівняння ефективності впливу фетальної сироватки теляти і сироватки крові корів в стані охоти на розвиток ооцитів корів *in vitro* і їх компетенцію до запліднення поза організмом (табл. 4).

Таблиця 4

Вплив еструсної сироватки крові корів на дозрівання і запліднення ооцитів корів поза організмом

Тип сироватки	К і л ь к і с т ь					
	ОКК з сильно розпушеним кумулюсом, n (%)	ооцитів на метафазі II		осі-мені-них ооци-тів, n	заплідне-них ооци-тів, %	ембріонів-ранніх стадій дроблення, %
		всього, n (%)	у т.ч. з хромосомними порушеннями, n (%)			
10% еструсної сироватки крові корів	41(83,7)	86(87,8)	10(11,6)	136	40,6*	24,6**
20% фетальної сироватки теляти (контроль)	37(80,4)	76(82,6)	8(10,5)	352	36,9*	16,5**

* - P > 0,05

** - P < 0,05

В наших експериментах не було відмічено вірогідного

впливу виготовленої нами еструсної сироватки крові корів на експансію кумулюса, частоту дозрівання, рівень хромосомних порушень і частоту запліднення ооцитів корів *in vitro*, в порівнянні з фетальною сироваткою теляти. Проте, подальший розвиток зигот залежав від типу сироватки, яка використовувалась при культивуванні ооцитів, що, мабуть, пояснюється тим, що еструсна сироватка крові корів сприяє кращому цитоплазматичному дозріванню ооцитів.

Певне значення в дослідях по заплідненню ооцитів корів *in vitro* має визначення моменту початку їх спільної інкубації із сперматозоїдами. Як показали наші дослідження, через 30 хвилин після центрифугування, на відміну від контролю, окремі сперматозоїди склеюються між собою голівками (по 2, 3 і в подальшому більшій кількості сперматозоїдів) і починають разом поступально рухатись, а надалі (ще через 10-20 хвилин), особливо при склеюванні великої кількості сперматозоїдів, здійснювати маневрні рухи. Спільне культивування таких сперматозоїдів з інтактними ооцитами корів, які дозріли *in vitro* ($n = 196$), привело до запліднення 42,9% жіночих гамет, що підтверджує те, що при появі перших сперматозоїдів з "липкими" голівками і слід відбирати поверхневий шар проінкубованих сперматозоїдів для поміщення його в середовище запліднення. Таким чином, одержані нами дані свідчать про можливість контролю придбання сперматозоїдами бугая здатності до запліднення *in vitro* шляхом безпосереднього візуального спостереження під мікроскопом.

Додаткові можливості при одержанні ембріонів відкриваються з використанням в дослідях по заплідненню *in vitro* методів мікроманіпуляцій. В наших дослідженнях ми вивчали

вплив часткового розсічення проворої оболонки скляною мікроголкою на запліднення ооцитів корів *in vitro* і подальший розвиток зигот поза організмом. Результати досліджень показали, що розсічення невеликої ділянки проворої оболонки у 0,5 М розчині цукрози значно збільшує частоту запліднення ооцитів сім'ям з дещо зниженою концентрацією сперматозоїдів (10^6 сп/мл) ($P < 0,001$) і не відбивається негативно на подальшому розвитку зигот до ранніх стадій дроблення (табл. 5).

Таблиця 5
Вплив часткового розсічення проворої оболонки на запліднюваність ооцитів корів

Групи дослідів	Всього дослідів	Кількість яйцеклітин, %			% дроблення	% запліднення*
		з одним про-оцитів і ембріонів	з двома про-оцями і клеу-сом	з трьо-ма і більшою кіль-кістю про-оцями і леусів		
Дослідна	172	2,3	23,3	2,3 ^{жж}	23,3	48,9 ^{жжж}
Контрольна	212	9,4	5,7	1,9 ^{жж}	17,0	24,5 ^{жжж}
Контроль на партеногенез	55	5,5	7,3	1,8	0	-

* - ембріони + яйцеклітини з двома і більшою кількістю прооцями і леусів

жж - $P > 0,05$; жжж - $P < 0,001$

Кількість ооцитів, які розвилися до ранніх стадій дроблення - 2-, 3- і 4-бластомерних ембріонів, - в дослідній групі була більшою, ніж в контрольній - 23,3 і 17%, відповідно. Важливим є той факт, що часткове розсічення проворої оболонки яйцеклітин не підвищувало частоти появи партеногенетичних зигот з одним прооцитом (2,3%) і рівня поліспермного запліднення (2,3%) у порівнянні з даними контрольної

групи (9,4 і 1,9%, відповідно), а активовані до партеногенетичного розвитку ЧРО-яйцеклітини не зазнавали ділень дроблення. Кількість клітин з поліспермним заплідненням була невеликою, мабуть, тому, що як встановлено на яйцеклітинах людини, розчин цукрови пригнічує множинну penetрацію сперматозоїдами ооцитів після просвердлювання або часткового розсічення їх прозорої оболонки /Cohen e. a., 1989; Malter e. a., 1989/.

3.3. Подолання блоку дроблення ембріонів великої рогатої худоби *in vitro*

В наших дослідженнях показано, що культивування *in vitro* зигот великої рогатої худоби на моношарі епітеліальних клітин яйцепроводів корів, яєчник яких мав новоутворене жовте тіло (ЕКЯЖТ), та у свіжоодержаному кондиційованому на цьому моношарі середовищі дозволяє подолати блок дроблення і сприяє розвитку до стадії морули-бластоцисти 43,1 і 44,2% та бластоцисти 29,1 і 23,3% ембріонів, які дробились, відповідно (табл. 6). Менш придатним в цьому відношенні, як показали експерименти, був моношар епітеліальних клітин яйцепроводів корів, яєчник яких мав ознаки недавньої овуляції (ЕКЯО) - лише 28,2% ембріонів, які дробились, досягли стадії морули-бластоцисти, а 15,5% ембріонів - стадії бластоцисти; при культивуванні на цьому моношарі також спостерігалась найбільша кількість дегенерованих морул-бластоцист.

Цитогенетичний аналіз препаратів одержаних *in vitro* ембріонів, які розвивались нормально, виявив наявність морфологічно нормальних ядер, які містили диплоїдний набір хромосом. Наші спостереження показали, що на 2-бластомірній стадії ядра ембріонів великої рогатої худоби мають організа-

Таблиця 6.

Розвиток in vitro в різних системах культивування яйцеклітин корів, які дозріли та були запліднені поза організмом (тривалість культивування - 184 години)^

Система культивування	Всього запліднених яйцеклітин	Кількість ембріонів, які дробились, n(%)	Пізніх морул			Бластоцист		
			n	% від кількості ембріонів, які дробились	кількість дегенерованих морул	n	% від кількості ембріонів, які дробились	кількість дегенерованих бластоцист
Моношар ЕКЯЖТ	137	86 (62,8)^	12	14,0	2	25	29,1^^^	-
Моношар ЕКЯО	125	71 (56,8)^	9	12,7	2	11	15,5	1
Свіжоодержане кондиційоване на моношарі ЕКЯЖТ середовище	66	43 (65,0)^	9	20,9	1	10	23,3	-
199 + 20% фетальної сироватки теляти (контроль)	91	48 (52,7)	-	-	-	-	-	-

^ - ооцити дозрівали в середовищі з еструсною сироваткою крові корів і інкубувались із сперматозоїдами без звільнення від клітин кумулюса

^^ - $P > 0,05$

^^^ - $P < 0,05$ для морфологічно нормальних бластоцист в порівнянні з моношаром ЕКЯО

цію, подібну до організації хроматину у пронуклеусів, проте, вже у ембріонів 8-клітинної стадії, в ядрах спостерігаються типові ядерця, і вони мають структуру, подібну до ядер півдніх морул та бластоцист.

Порівняння цитоморфологічних характеристик бластоцист, одержаних *in vitro* та *in vivo* ($n = 35$), показало, що ранні бластоцисти, одержані поза організмом, мали властиві для даної стадії кількість клітин (> 64) і діаметр прозорої оболонки (150-170 мкм), виражений бластоціль, добре помітні клітини трофтодерми і внутрішньої клітинної маси. В процесі розвитку *in vitro* у бластоцист, одержаних поза організмом, відмічалось типове для даної стадії розвитку збільшення розміру і потоншення прозорої оболонки (n клітин бластоцисти > 130 , діаметр - 180-210 мкм).

Дві бластоцисти, одержані *in vitro* на моношарі епітеліальних клітин яйцепроводів корів, яечник яких містив новоутворене жовте тіло, - експандована і повністю експандована - були пересаджені телицям-реципієнтам.

Таблиця 7

Вплив стадії розвитку ембріонів на їх здатність до розвитку до морули-бластоцисти на моношарі ЕКЯЖТ (тривалість культивування - 160 годин)

Стадія розвитку ембріона	Всього ембріонів, які дробились	Кількість ембріонів, які досягли стадії					
		наступного ділення дроблення		пізньої морули		бластоцисти	
		<i>n</i>	%	<i>n</i>	%	<i>n</i>	%
2-клітинна	44	19	43,2	9	20,5	1	2,3*
3-клітинна	3	1	33,3	-	-	-	-
4-клітинна	39	39	100,0	3	7,7	24	61,5*

* - $P < 0,001$

Таблиця 8
Динаміка розвитку осіменених in vitro ооцитів корів
(n = 276) на моношарі ЕКЯЖТ

Переважаючі стадії розвитку ембріонів, які розвивались, на час оцінки	n	%	
		від кількості осіменених ооцитів	від кількості ембріонів, які розвивались
18 годин після початку осіменіння			
Зигота	137	49,6	-
42 години після початку осіменіння			
2-клітинна стадія	44	15,9	51,2
3-клітинна стадія	3	1,1	3,5
4-клітинна стадія	39	14,1	45,3
Всього	86	31,1	100,0
66 годин після початку осіменіння			
4-клітинна стадія	19	6,9	32,2
6-8-клітинна стадія	40	14,5	67,8
Всього	59	21,4	100,0
114 годин після початку осіменіння			
6-8-клітинна стадія	16	5,8	29,6
10-16-клітинна стадія	35	12,7	64,8
Рання морула (>16 клітин)	3	1,1	5,6
Всього	54	19,6	100,0
162 години після початку осіменіння (6-денні ембріони)			
Рання морула	30	10,9	71,4
Пізня морула (32-64 клітин)	12	4,3	28,6
Бластоциста	-	-	-
Всього	42	15,2	100,0
186 годин після початку осіменіння (7-денні ембріони)			
Рання морула	7	2,5	16,7
Пізня морула	17	6,2	40,5
Бластоциста (рання, яка розширюється)	18	6,5	42,8
Всього	42	15,2	100,0
202 години після початку осіменіння			
Пізня морула	12	4,3	32,4
Бластоциста (рання, яка розширюється, повністю експандована)	25	9,1	67,6
Всього	37	13,4	100,0
6-денні ембріони, одержані in vivo			
Рання морула	16	-	84,2
Пізня морула	3	-	15,8
Бластоциста	-	-	-
Всього	19	-	100,0
7-денні ембріони, одержані in vivo			
Рання морула	4	-	5,8
Пізня морула	30	-	43,5
Бластоциста (рання, яка розширюється)	35	-	50,7
Всього	69	-	100,0

В іншій серії експериментів показано взаємозв'язок між стадією розвитку, якої досягають ембріони великої рогатої худоби через 24 години після запліднення ооцитів *in vitro* (через 42 години після початку осіменіння), і їх подальшим розвитком до стадії пізньої морули-бластоцисти (табл. 7) - 4-клітинні ембріони мають значно кращу здатність до розвитку *in vitro*, в порівнянні з 2-клітинними.

Нами було проведено аналіз динаміки розвитку *in vitro* ранніх ембріонів великої рогатої худоби, одержаних поза організмом, на моношарі ЕКЯЖТ (табл. 8). Порівняння даних, одержаних через 114 і 162 години після початку осіменіння *in vitro*, показало, що 77,8% (42/54) 6-16-клітинних ембріонів великої рогатої худоби розвивались нормально і подолали блок дроблення на стадії 8-16 клітин. Порівняльний аналіз показав, що 6- і 7-денні ембріони великої рогатої худоби, отримані *in vitro*, перебувають на тих же стадіях розвитку, що і 6- і 7-денні ембріони, вимиті з рогів матки корів-донорів.

В И С Н О В К И

1. Гетерологічна penetрація яйцеклітин золотистого хом'ячка дозволяє одержувати прометафазні і метафазні хромосоми сперматозоїдів бугая, капацитованих *in vitro* за допомогою гепарину.

2. Комплексний метод оцінки запліднюючої здатності сперматозоїдів бугаїв *in vitro* дозволяє здійснити селекцію бугаїв для дослідів по одержанню ембріонів великої рогатої худоби *in vitro*.

3. Початок спільної інкубації *in vitro* ооцитів і сперматозоїдів великої рогатої худоби слід проводити при появі сперматозоїдів із "липкими" голівками.

4. Розсічення фолікулів яєчників корів дозволяє одержати більше ооцитів і ембріонів, в порівнянні з аспірацією ооцитів.

5. Встановлено позитивний вплив еструсної сироватки крові корів на дозрівання і запліднення ооцитів корів *in vitro* та повного збереження розпушеного кумулюса під час запліднення - на їх дроблення.

6. Часткове розсічення прозорої оболонки ооцитів корів сприяло збільшенню частоти запліднення *in vitro* ооцитів сім'ям зі зниженою концентрацією сперматозоїдів і не відбивалось негативно на подальшому розвитку зигот до ембріонів ранніх стадій дроблення.

7. Культивування *in vitro* зигот та ембріонів ранніх стадій дроблення на моношарі ЕКЯЖТ та у кондиційованому на цьому моношарі середовищі дозволило одержати більше морфологічно нормальних морул та бластоцист великої рогатої худоби, ніж на моношарі ЕКЯО.

8. Цитоморфологічні характеристики морул і бластоцист великої рогатої худоби, одержаних *in vitro*, були подібними до аналогічних показників морул і бластоцист, одержаних *in vivo*.

ПРАКТИЧНІ ПРОПОЗИЦІЇ

1. Комплексний метод оцінки запліднюючої здатності сперматозоїдів бугаїв *in vitro*, розроблений для відбору бугаїв для дослідів по одержанню ембріонів великої рогатої худоби поза організмом, може бути в подальшому використаний при відборі плідників для штучного осіменіння.

2. При проведенні експериментів по одержанню ембріонів великої рогатої худоби *in vitro* треба використовувати ес-

трусну сироватку крові корів при дозріванні ооцитів і інтактні ооцит-кумулясні комплекси для запліднення; для одержання бластоцист великої рогатої худоби *in vitro* культивування ранніх ембріонів здійснювати на моношарі епітеліальних клітин яйцепроводів корів, яєчник яких має новоутворене жовте тіло, або в кондиційованому на цьому моношарі середовищі.

3. Результати досліджень можуть бути використані в учбових курсах на кафедрах генетики, біотехнології і ембріології університетів, сільськогосподарських і ветеринарних інститутів.

Список основних праць, опублікованих по темі дисертації

1. Кузнецов В. Е., Елизарова І. В. Разработка метода одержання препаратів хромосом сперміїв бугая // Вісник с.-г. науки. - 1988. - № 8. - С. 53-55.

2. Кузнецов В. Е., Елизарова И. В. Визуальный метод определения готовности сперматозоидов быка к оплодотворению *in vitro* // Бюлл. ВНИИРЖ. - Л., 1991. - Вып. 129. - С. 18-21.

3. Редина О. Е., Амстиславский С. Я., Макоимовский Л. Ф., Кузнецов В. Е., Елизарова И. В. Суперовуляция у двух видов лабораторных животных при введении им гонадотропина СЖК в разные фазы эстрального цикла // Сиб. биол. журн. - 1992. - Вып. 2. - С. 24-28.

4. Кузнецов В. Е., Елизарова И. В. Партеногенетическая активация ооцитов коров, созревших *in vitro* // Онтогенез. - 1992. - 23, 6. - С. 650-653.

5. Буркат В. П., Кузнецов В. Е., Елизарова И. В. Биотехнологические методы оценки и прогнозирования оплодотворяющей способности сперматозоидов быков // Вісн. агр. науки. - 1992. - № 11. - С. 22-26.

6. Зубец М. В. , Кузнецов В. Е. , Елизарова И. В. Оплодотворение *in vitro* ооцитов коров с частично рассеченной прозрачной оболочкой //Вісн. агр. науки. - 1993. - N 7. - С. 47-54.

7. Зубец М. В. , Кузнецов В. Е. , Елизарова И. В. , Шеховцов С. Ю. , Шеховцова Е. Ю. Трансплантация половинок - эффективный метод увеличения количества телят от доноров эмбрионов //Вісн. агр. науки. - 1994. - N 7. - С. 67-73.

8. Елизарова И. В. Гетерологическое оплодотворение *in vitro* сперматозоидами быка яйцеклеток золотистого хомячка //Тез. докл. Всес. научно-техн. совещ. в ВИЖе, 9-10 октября 1990 г., Дубровицы, 1990, "Проблемы развития биотехнологии в животноводстве", С. 36-38.

9. Kuznetsov, V. E. , Yelizarova, I. B. *In vitro* production of bovine embryos using a microsurgery method //Proc. First Eur. Conf. "Embryo Technology and Genetic Engineering in Cattle and Sheep Breeding", Krakow, Poland, 1994, P. 221.

10. Елизарова И. В. Одержання препаратів хромосом ембріонів великої рогатої худоби, отриманих *in vitro* //Тез. допов. наук.-практ. конф. "Генетико-селекційні та технологічні проблеми відтворення с.-г. тварин", Київ, 1994, С. 80.

11. Кузнецов В. Е. , Елизарова И. В. , Мадисон В. В. , Мадисон Л. В. Трансплантация blastocист великої рогатої худоби, отриманих *in vitro* //Тез. допов. Всеукр. ювіл. наук.-практ. конф. "Генетика продуктивності тварин", 20-21 грудня 1994 р., Київ, 1994, С. 19.

12. Елизарова И. В. Динаміка розвитку *in vitro* ранніх ембріонів великої рогатої худоби, одержаних поза організмом //Тез. допов. Всеукр. ювіл. наук.-практ. конф. "Генетика продуктивності тварин", 20-21 грудня 1994 р., Київ, 1994, С. 51.

Елизарова И. Б. Цитогенетические аспекты оплодотворения *in vitro* ооцитов коров и гетерологической пенетрации яйцеклеток золотистого хомячка.

Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.00.15-генетика, Институт разведения и генетики животных УААН, с. Чубинское, Киевской обл., 1995.

Разработан метод оценки оплодотворяющей способности сперматозоидов быков *in vitro* с помощью гетеро- и гомологической пенетрации ооцитов, получены метафазные хромосомы сперматозоидов быка, изучены цитоморфологические характеристики эмбрионов крупного рогатого скота, полученных *in vitro*.

Yelizarova, I.B. Cytogenetic aspects of *in vitro* fertilization of cow oocytes and heterologous penetration of golden hamster ova.

Thesis for competition of academic degree of candidate of biological science from speciality 03.00.15-Genetics, Institute of Animal Breeding and Genetics UAAS, v. Chubinskoye, Kiev Region, 1995.

Method of estimation of bull spermatozoa fertilizing ability *in vitro* with the using of hetero- and homologous oocyte penetration had been work out, metaphase chromosomes of bull spermatozoa had been obtained, cytomorphological characteristics of bovine embryos produced *in vitro* had been studied.

Ключові слова: ооцит, ембріон, гетеро- і гомологічна пенетрація, цитогенетичні аспекти.

Підписано до друку 18.04.95р. формат 60x84/16

Папір друк. Умов. друк. л. I, O. Тираж 100 экз. Заказ М582

Надруковано ЦУОП ДНП "Плодвінконсерв" м. Київ, Саксаганського, 1

AB 32.362