

recipients in individual farms. Recipient's breed insignificantly influenced on calving rates.

УДК 636.22/28:57.08

А. В. МАДІЧ

Інститут біології тварин УААН

## РЕГУЛЯТОРНІ МЕХАНІЗМИ РАНЬОГО ЕМБРІОНАЛЬНОГО РОЗВИТКУ

---

*Узагальнено літературні дані та результати власних досліджень про регуляторні механізми раннього ембріонального розвитку тварин. Показано, що без розуміння складних біологічних процесів оо- та ембріогенезу, внутрішніх для системи ембріон-материнський організм факторів не можна створити загальні моделі (теорії) їхнього формування, а отже, й розробити сучасні біотехнології для управління розвитком і підтримки оптимального функціонування біологічних об'єктів *in vivo* та *in vitro*.*

**Ембріональний розвиток, клітинна інженерія, ооцити, ембріони**

***Критичні періоди ембріонального розвитку *in vivo* та *in vitro*.***

Використання методів клітинної інженерії довели існування в доімплантаційних ембріонах тварин значних регуляторних здібностей. До них відносять морфологічний потенціал окремих бластомерів до подальшого розвитку, здатність частково дегенерованих ембріонів або їхніх половинок поновлювати свою цілісність, інтегрувати додаткові клітини, секретувати специфічні молекули білкової природи тощо. Неправильне або недостатнє харчування матері, різкі температурні зміни, нестача кисню, зміна рН оточуючого ембріон середовища, хворобливі агенти — далеко неповний перелік факторів, які можуть викликати дефекти морфогенезу і загибель ембріонів *in vivo*. Із

© А.В. Мадіч, 2006

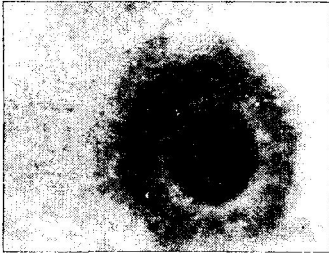
Розведення і генетика тварин. 2006. Вип. 40.

застосуванням методів ембріобіотехнології кількість дестабілізуючих факторів та критичних періодів розвитку яйцеклітин і ембріонів в умовах *in vitro* та *in vivo* істотно збільшилася. Так лише транспортування яєчників після забою тварин у лабораторію та перебування в них ооцитів більш, ніж 2–4 год призводить до зниження їхньої життєздатності й компетенції до подальшого розвитку [9].

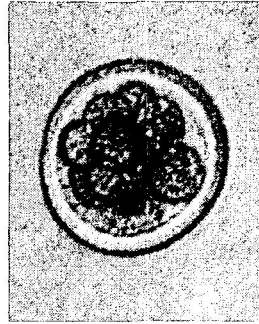
*Перший критичний період* збігається із заплідненням зиготи і початком її мітотичного дроблення, що значною мірою залежить від дозрівання ооцитів, яке за умов *in vitro* може бути неповним унаслідок тих чи інших причин. Ембріональна смертність на цьому етапі становить найбільший відсоток, якщо секреторна активність кумулюсних клітин недостатня. Спостереженнями С.С. Silva і P.G. Knight [14] було підтверджено гіпотезу секреції клітинами кумулюсу специфічних білків активіну-А і фолістатину, які відіграють важливу регуляторну роль у процесі дозрівання ооцитів (рисунок, А). Установлено, що імунореактивність рецепторів активіну-А в мембрані кумулюсних клітин і оолеми ооциткумулюсних комплексів збільшується протягом дозрівання ооцитів у культурі, вказує на паракринний і аутокринний характер дії активіну-А й модулюється інгібуючою дією інгібіну та (або) фолістатину [12]. Методом гелевого електрофорезу була встановлена присутність в ооплазмі денудованих ооцитів корів специфічного фактора росту (*Maturation promoting factor* — MPF), який є ініціатором стадії інтерфази ооцитів [7]. Це підтвердило необхідність їхнього дозрівання *in vitro* групами по 10–15 ооцитів у мікрокраплях середовища для підсилення життєздатності з використанням власних специфічних факторів росту.

Після активування спермою дозрілих ооцитів, яка є ініціатором процесу розвитку і змін у внутрішній структурі зиготи, починається дроблення (рисунок, В). Воно відбувається згідно з часом послідовних мітотичних поділів і веретен дроблення, які є основою цитоскелетного матриксу зиготи. Регуляція мітотичних поділів забезпечується «внутрішнім годинником» дроблення. За його допомогою ембріон «відраховує» кількість завершених циклів і «визначає» параметри наступних. Достеменно відомо, що ці важливі події відбуваються за участю специфічних гормоноподібних речовин, поліпептидних факторів росту, які стимулю-

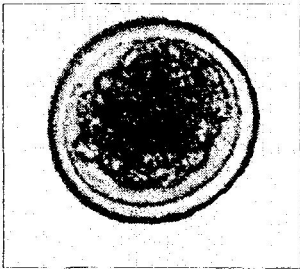
ють проліферативну активність ембріональних клітин тварин та людини і, по суті, є інформаційними молекулами, розташованими в окремих ділянках цитоплазми зиготи. Локалізовані інформаційні системи відіграють важливу роль у визначенні долі окремих ділянок ембріона протягом його розвитку.



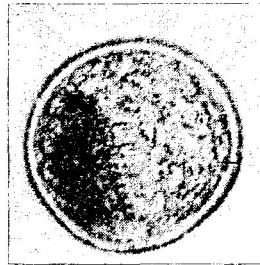
*A*



*B*



*C*



*D*

*Молекулярні механізми раннього ембріонального розвитку.*

*A.* Дозрівання ооцит-кумулосних комплексів: секреція клітинами кумулюсу активіну і фолістатину (інгібіну); секреція ооплазмою фактора росту ооцитів (maturation promoting factor — MPF); секреція ооплазмою ОКК IGF-1; накопичення в ооплазмі цАМФ.

*B.* Активація спермою і початок дроблення зиготи: локалізація на ділянках цитоплазми поліпептидних факторів росту (інформаційних молекул); функціонування на мембрані бластомерів біорегуляторів мітозу (цикліну А), низькомолекулярних фізіологічних речовин (аце-

тилхоліну, катехоламінів, серотоніну), поліпептидних факторів росту, продуктів деяких протоонкогенів.

**С. Подальше дроблення й утворення компактної морули:** синтез цитоплазмю бластомерів конексину 43 (С43), відповідального за утворення міжклітинних з'єднань; локалізація рецепторів ростових факторів на прозорій оболонці; секреція ростових факторів IGF-2 та EGF (регуляція проліферації).

**Д. Експандована бластоциста:** секреція трофобластом трофобластичного інтерферону; секреція диференційованими бластомерами TGF- $\alpha$ .

Одночасно з дробленням в ембріоні проходять процеси первинної диференціації бластомерів на ембріобласт і трофобласт, які відбуваються за участю біорегуляторів мітозу. Так білок циклін А (див. рисунок), який винайдено в зародках морського їжака і кодується матричною РНК, руйнується перед кожним мітотичним дробленням. Жорстка періодичність його функціонування припускає важливу роль цикліну А у регуляції проліферації клітин у ранньому ембріогенезі, зокрема для початку мітозу, 1-го мейотичного поділу [6].

Не менш важливу регуляторну функцію під час клітинного поділу відіграють низькомолекулярні фізіологічно активні речовини (ацетилхолін, катехоламіни, серотонін), поліпептидні фактори росту і продукти деяких протоонкогенів. Ці речовини також безпосередньо беруть участь у регуляції розмноження клітин. Крім того, бластомери ранніх ембріонів тварин здатні самі синтезувати такі фактори, а їхній синтез може відбуватися з використанням матричної РНК [4]. Звідси виникає пояснення обмеженого впливу організму реципієнтної матері на генотип і фенотип нащадків, народжених унаслідок трансплантації ембріонів.

На початкових етапах ембріогенезу бластомери містять достатню кількість пластичних, енергетичних матеріалів і ферментів, що забезпечують утилізацію цих матеріалів у процесі мейозу. Протягом дроблення більшість необхідних білків надходять із запасів, накопичених у яйцеклітинах ще під час оогенезу. Секреторну активність ембріонів доведено численними експериментами з підсаджування додаткових ембріонів та трофобластичних

кульок на великій рогатій худобі [5]. У. Неуман та ін. у 1995 р. [11] отримали 63,5% тільностей від трасплантації пари клонованих ембріонів проти 29,4% від поодиноких пересаджень. У цьому експерименті було одержано 26 телят, з них 7 сетів (клонів), у кожному від 2 до 5 тварин з нормальною живою масою.

Доведено секреторну активність доімплантаційних ембріонів корів і в умовах *in vitro* [16]. Для стимуляції їхнього подальшого розвитку вони, як і ооцити, повинні інкубуватися групами, оскільки культивування по одному блокує дроблення на 8–16-бластомерній стадії. Зі збільшенням кількості мітотичних циклів потенційна здатність бластомерів до подальшого розвитку зменшується, що пов'язується зі спадом їхньої секреторної активності й переходом від материнського до ембріонального контролю за розвитком. Ці події визначають *другий критичний період* ембріонального розвитку тварин. Бластомери, які утворилися в результаті перших 4 циклів дроблення, володіють найбільшою потенцією до розвитку і утворюють більше клітин для формування внутрішньої клітинної маси. Згодом це положення було використано в експериментах з пересаджування ядра бластомера в енукейовану яйцеклітину. Застосування фідерних клітинних моношарів, а саме клітин гранульози, кумулюсу, ембріонального фібробласта, епітеліальних клітин яйцепроводів корів (культура *Bovine Oviduct Epithelial Cells* – BOEC), клітин печінки шура (культура *Buffalo Rat Liver Cells* – BRLC) дало змогу різним авторам перемогти блок дроблення ембріонів поза організмом, дещо стимулювати ембріональний розвиток і одержати трансферабельні морули та бластоцисти [1, 2, 15, 17].

Умовою подальшого розвитку ембріона є тісний взаємозв'язок між бластомерами, що зберігається до утворення бластопорожнини (рисунк,С). Їхня компактність здійснюється завдяки десмосомам, які пов'язані з тонофібрілярною системою цитоплазми і виконують роль механічного зв'язку клітин. За умов часткового руйнування цитоскелетного матриксу бластомери набувають більшої автономності і більш чутливі до тих чи інших екзогенних впливів. Так стійкість ранніх ембріонів корів до трансформуючого впливу вірусу саркоми Рауса проявлялася

лише в тому разі, коли міжклітинні контакти лишалися інтактними [8].

Механізм дії щільових з'єднань *gap junction* у доімплантаційних ембріонах корів, одержаних *in vivo* та *in vitro*, було розглянуто С. Wrenzucki [10]. Автори досліджували присутність м-РНК, що кодує специфічний білок конексин 43 (Cx43), відповідальний за утворення в ранніх ембріонах цих з'єднань. Вміст загальної м-РНК, одержаної з 60 ооцитів і 200 ембріонів корів за допомогою модифікованого методу фенол-хлороформної екстракції, аналізували за результатами ПЛР. Cx43-транскрипції було виявлено в морулах та бластоцистах, що розвинулися в умовах *in vivo*. У ранніх ембріонах, одержаних *in vitro*, експресію м-РНК цього гена спостерігали на стадіях від ооцит-кумуляного комплексу до морули, однак наявність її в експандованих і звільнених від оболонки бластоцистах не було встановлено. Автори висунули гіпотезу, що в об'єктах, розвинутих *in vitro*, ген білка Cx43 або не був активований, для чого необхідна участь стабільних матричних транскрипцій, або експресія ембріонального гена припинялася з внутрішніх причин. Таким чином, умови культивування *in vitro* істотно впливали на експресію Cx43 гена.

Одночасно зі збільшенням кількості бластомерів і компактністю прискорюється їхня диференціація, яку пояснюють, зокрема, метаболічною активністю ембріональних клітин (рисунок, D). Витончення прозорої оболонки ембріонів ссавців зазвичай супроводжується накопиченням у бластомерах цитоплазматичних везикулів. Вони секретують рідину у бластопорожнину, що з'являється паралельно з утворенням пухкої структури експандованих бластоцист натомість щільних міжклітинних з'єднань, характерних для морул. Механізм цього процесу вивчається.

Як відомо, прозора оболонка є природним бар'єром ооцита та ембріона, яка, однак, не перешкоджає проникненню сперміїв і заплідненню. Під її захистом відбуваються перші стадії дроблення, процеси ранньої диференціації первинних бластомерів, утворення бластопорожнини. Вона виконує механічну й захисну функції, її вибіркова проникність уможли-

лює транспорт тільки тих речовин з материнського оточення, які сприяють розвитку ембріона. Це місце локалізації рецепторів ростових факторів — специфічних білкових молекул, які забезпечують на певних етапах ембріогенезу зв'язок між ембріоном і репродуктивними шляхами матері. Еластичність прозорої оболонки припускає її значне розтягнення під тиском збільшеної бластомерної маси й розширення бластопорожнини. Так у латентний період ембріональної діапаузи норок прозора оболонка завдяки своїй еластичності витончується, а реекспандована бластоциста збільшується у 2–2,5 раза порівняно з попередньою стадією розвитку.

Механізм утворення гігантських реекспандованих 8-денних бластоцист норок досліджувався нами з метою вивчення морфологічних особливостей доімплантаційних ембріонів цих хутрових тварин [3]. Поряд з розширеними (експандованими) бластоцистами розміром 140–155 мкм, які характеризувалися чіткою первинною диференціацією бластомерів на ембріо- і трофобласт за класичним типом, одночасно спостерігали бластоцисти діаметром 240–300 мкм, що ідентифікували як реекспандовані бластоцисти початку латентного періоду ембріональної діапаузи. Їхня прозора оболонка була витонченою, перивітеліновий простір займав майже весь об'єм, а сама бластоциста нагадувала блюдце з широкими краями і темною серединою. Вважають, що в цей час ембріони перебувають у стані «очікування» відповідних умов для імплантації, перш за все — функціонування жовтих тіл вагітності. У норок ембріональна діапауза зтягується до 40 днів, горностаям властива затримка до 7 міс. (обидва види належать до родини куніць). У жодній реекспандованій бластоцисті норок ( $n=39$ ) ми не спостерігали наявності дегенерованих бластомерів або позаембріонального клітинного матеріалу у перивітеліновому просторі, що, очевидно, є свідченням стабільності внутрішньоклітинних процесів чи припинення їх на цій стадії розвитку. Характерне для ембріональної діапаузи накопичення рідини у перивітеліновому просторі ембріонів норок 8-го дня супроводжувалося ретракцією клітин трофобласта у напрямку до центра, максимальним скороченням бластопорожнини, збільшення

ембріонами об'єму. Під час стискання бластомерів характер зчеплення клітин змінювався: бластомерна маса ставала максимально ущільненою. Оскільки на процеси первинної диференціації впливає перерозподілення кальцію в окремих ділянках цитоплазматичних мембран бластомерів, ущільненість клітинної маси у реекспандованих бластоцистах норок, а значить, і переміщення мікроструктур у десмомомах (мікрофіламентів, кортикальних, поверхневих мікротубул), сприяли зупиненню подальшої диференціації. Відомо, що кальцій виконує функції, необхідні для накопичення рідини у перивітеліновому просторі, а також створює пропускний бар'єр між середовищем, яке оточує ембріон з одного боку, і перивітеліновим простором та середовищем бластопорожнини — з другого. Бар'єр такого типу, можливо, сприяв виникненню специфічних умов для дії механізмів, які відповідають за утворення гігантських реекспандованих бластоцист норок. Отже, в ембріонах норок початку латентного періоду ембріональної діапаузи, що є одним з різновидів природного гіпобіозу, створюються специфічні умови, які забезпечують активний перехід рідини як з бластоцелю, так, очевидно, і ззовні, крізь прозору оболонку в перивітеліновий простір ембріона. Припинення або затримання процесів диференціації гальмують секрецію бластоцистами трофобластичного інтерферону та виникнення факторів, відповідальних за формування ембріонально-маткового сигналу. Подальше глибоке вивчення молекулярного механізму ініціації цього процесу може знайти широке практичне застосування у розробці нових методів зберігання ембріонів інших тварин без кріоконсервації.

*Третій критичний період* ембріонального розвитку пов'язують з денудацією бластоцисти — звільненням її від прозорої оболонки, який у різних видів тварин відбувається в неоднакові терміни. Вважають, що специфічні ферменти трофобласта розчиняють її і полегшують розрив. У цей період у більшості багатоплідних тварин (свині, хутрові) певний відсоток ембріонів зазнає незворотних змін і найчастіше гине.

Існує кілька гіпотез щодо процесів доімплантаційного розвитку ембріона й ускладнення його форми. Одну з них викладе-



но у 1997 р. М.Д. Безуглим. Вона ґрунтується на певних розрахунках осмотичного складу зародків, об'єму і форми бластомерів, механізму утворення бластопорожнини, еластичних властивостях прозорої оболонки. Інша стосується механізмів передачі регуляторних сигналів у зиготах і ембріонах та пов'язана з функціонуванням поліпептидів як мембранних рецепторів, що містять насичені гідрофобними амінокислотами ділянки, завдяки чому затримуються цитоплазматичними мембранами бластомерів. Як викладено вище, міжклітинні взаємодії відіграють важливу роль у ранньому ембріогенезі, а поліпептиди, можливо, забезпечують виконання цієї ролі.

**Формування ембріонально-маткового сигналу та стимулюючий вплив фідерних клітин на розвиток ембріонів.** Клітини трофобласта викликають децидуальну реакцію слизової оболонки матки і формують ембріонально-матковий сигнал під час імплантації зародка. За умов неможливості проникнення клітин трофобласта у строму ендометрію й фагоцитозу епітеліальних клітин відбувається відторгнення ембріонів. Ці факти на цитологічному рівні демонструють теорію критичних періодів розвитку.

Було доведено, що білки ембріонального оточення, в свою чергу, активуються трофоектодермою 7-денних бластоцист. Ембріони задовго до імплантації починають виділяти інтерферони, які є сигналізаторами секреції маткою поліпептидного ростового фактора, транспорту прогестерону й інтерферонзалежних трофобластичних протеїнів, а також підтримують та активують функцію жовтого тіла. Таким чином, білок ембріонального трофобласта (*Bovine Trophoblast Protein* — ВТР-1 або *Sheep trophoblast protein* — СТР-1 з молекулярною масою близько 22–20 кДа відповідно) сприяє продовженню вагітності. Згодом це положення набуло практичного застосування: трофобластичні везикули стали використовувати для підтримки ембріонального розвитку *in vivo* у телиць і корів у спільних з ембріонами пересадженнях (за різними даними досягнуто підвищення приживленості на 17–50%). Властивість кластерів трофобласта агрегувати у везикули і зберігати свою функціональність у культурі стало основою для використання фраг-

ментів трофобласта для стимуляції процесу ембріонального розвитку *in vitro*.

Спеціальними експериментами з удосконалення техніки мікрохірургічного поділу ранніх ембріонів та підвищення морфологічної якості половинок нами визначалася ефективність співкультивування половинок нативних ембріонів з трофобластичними клітинами розморожених бластоцист та можливість їхнього повторного мікрохірургічного поділу з утворенням чвертей. Мікробіопсію трофобласта виконували за допомогою мікроманіпуляторів або мануально за методом видалення клітин з трофобластичних виростів 9–10-денних розморожених і задалегідь прокультивованих ембріонів корів. Фрагменти трофобласта відсікали мікроножем і відсмоктували мікропіпеткою. Через 24 год культивування у ДМЕМ з 20% ФСТ та 1%  $\alpha$ -глютаміну спостерігали агрегацію трофобластичних кластерів у трофобластичні кульки-везикули різних розмірів (85–93,5% ефективності) завдяки властивому їм явищу клітинної адгезії. Половинки ембріонів дослідної групи культивували групами з розрахунку чотири трофобластичні везикули на одну половинку в 1 мл поживного середовища, контрольної — без трофобластичних везикулів. Компактні половинки, що відновили дроблення, назвали ембріонами другої генерації (84,2% у дослідній групі проти 26,3% у контрольній) і знову поділили навпіл з утворенням чвертей. Їх залишали парами у власній оболонці й трансплантували парами реципієнтам. У цих дослідженнях 18,8% чвертей ембріонів корів розвинулися у плоди винятково завдяки співкультивуванню їх з трофобластичними везикулами. Було одержано три тільності, з них дві закінчилися народженням телят-близнюків.

Подібні результати з використанням стимулюючої дії трофобластичних везикулів одержано іншими авторами в експериментах з дозрівання та запліднення *in vitro* яйцеклітин корів. Культивування їх поза організмом з трофобластом дало змогу підвищити кількість якісних морул в окремих дослідах до 38%, а бластоцист — до 14% [13].

На стадії доімплантаційного розвитку ембріони одержують необхідні для них речовини з оточуючого середовища, а саме з

ембріотрофу, що секретується маткою. Специфічні для яйцепроводів білки, які виділяються клітинами епітелію й оточують ембріон, широко розповсюджені у ссавців. Їхня кількість, молекулярна маса й ізоелектричний потенціал варіюють між видами, однак деякі характеристики є загальними. Наприклад, секреція білків ампульної ділянки яйцепроводів відрізняється від такої в істмусі. Види білків різняться відносно періодів статевого дозрівання та фаз естрального циклу і, таким чином, підтверджують, що білки яйцепроводів контролюються стероїдними гормонами. Вони беруть участь у багатьох важливих процесах, пов'язаних зі становленням ембріогенезу. Ступінь такої участі різниться за видами. У кроликів рідина яйцепроводів формує тонкий муциновий шар, який оточує прозору оболонку ембріона, зберігається на всіх стадіях доімплантаційного розвитку до бластуляції. У мишей яйцепровідний глікопротеїн з молекулярною масою 25 кДа проникає у перивітеліновий простір раннього ембріона. У корів білки яйцепроводів взаємодіють з флокулентними (осадовими) та аморфними речовинами перивітелінового простору, а в ембріонів свиней і овець досягають цитоплазматичної мембрани бластомерів. У приматів та хом'яків вони можуть знаходитись ще глибше — в ооплазмі яйцеклітин і цитоплазмі бластомерів ранніх ембріонів.

Клітинні культури ембріонального або маткового походження, так звані фідерні клітини, мають стимулюючу дію на розвиток ооцитів та ембріонів ранніх стадій. Їхнє використання дає змогу оптимізувати умови розвитку *in vitro* і наблизити їх до умов *in vivo*. Ми використовували моношар епітеліальних клітин яйцепроводів корів для культивування половинок розморожених морул корів і одержання ембріонів другої генерації. Половинки ембріонів культивували протягом трьох діб з розрахунку 3—4 половинки на 100 мкл клітинної суспензії в 1 мл ТСМ-199 з 20% ФСТ й антибіотиками з оцінкою їхньої морфології через кожні 12 год. Їхні пари були контрольною групою, яку культивували в аналогічному середовищі без підтримуючої дії фідерних клітин. Уже впродовж перших 12 год морфологічна якість половинок контрольної групи зменшилася до 54,5%, а в

дослідній якісними лишалися 72,7%. Через 48 год їхня кількість у дослідній групі зменшилася до 45,5% проти 13,6% на контролі. Далі спостерігали поступове зменшення морфологічно якісних половинок обох груп, однак через 60 год майже всі половинки контрольної групи дегенерували, а у дослідній 31,8% лишалися життєздатними. Через 72 год 27,3% половинок контрольної групи було оцінено як морфологічно якісні.

Отже, на підставі того, що фідерні клітини ембріонального або маткового походження здатні підтримувати ранній ембріональний розвиток *in vitro* завдяки секреції специфічних для них факторів росту, можна стверджувати, що співкультивування трофобластичних кластерів з половинками мікрохірургічно поділених ембріонів або застосування фідерних моношарів епітеліальних клітин з достатньою проліферацією у культурі може суттєво підтримати й активувати розвиток груп бластомерів у повноцінні зародки другої генерації. За цих умов буде можливою друга вдала бісекція половинок з одержанням життєздатних чвертей, що є ембріональним клоном. За умов життєздатності *in vivo* зародків, поділених навпіл удруге, цей показник збільшується вдвоє і може становити вже близько 54–60% з отриманням клону з двох, трьох і більше нащадків-близнюків, котрі походять з одного ембріона. Народження ідентичних тварин доводить, що цей нескладний метод ембріонального клонування заслуговує на широке практичне впровадження, оскільки відносно проста культуральна система фідерних клітин маткового походження, одержана з дешевого забійного матеріалу, здатна забезпечити сприятливі умови для транспорту половинок на місце трансплантації їх тваринам-реципієнтам на відносно далекі відстані без кріоконсервації. Вона може бути застосована як тест-система для оцінки результатів будь-яких мікроманіпуляцій з ооцитами та ембріонами тварин у системі ембріобіотехнології завдяки використанню рістстимулюючого впливу.

**Висновок.** Дослідження клітинних взаємодій на ранньому етапі ембріогенезу і спрямований вплив на них з метою одержання значної кількості ембріонів та тварин бажаного генотипу лишаються актуальними. Біотехнологічні методи, що застосо-

вуються на ембріонах тварин, при високій достовірності та значній різноманітності одержаної за їхньою допомогою інформації, не позбавлені низки суттєвих недоліків. Головні з них — відносно низька результативність в одержанні життєздатних ембріонів, здатних розвинути у плід після трансплантації реципієнта. Причини високої ембріональної смертності у таких експериментах залишаються нез'ясованими. Вочевидь, відповідь треба шукати у вивченні процесів дисоціації, диференціації ембріональних клітин, формування матково-ембріонального сигналу на доімплантаційних стадіях.

У процесі накопичення наукової інформації стає зрозумілим, що найкращими умовами для генерації оо- і ембріогенезу лишаються умови максимально наближені до умов *in vivo*. Використання фідерних клітинних систем маткового та ембріонального походження або синтетичних середовищ, ідентичних до рідини яйцепроводів, активує розвиток *in vitro*, а саме процеси цитоплазматичного та ядерного дозрівання ооцитів, полегшує подолання блоку дроблення ранніх ембріонів і дає можливість отримати повноцінні трансферабельні зародки, здатні розвинути *in vivo* у плід. А відтак можна зробити висновки, що будь-які втручання у життєдіяльність і функціональність ембріональних клітин відображаються на їхній виживаності як за умов *in vivo*, так і *in vitro*. Однак застосування методів і прийомів, здатних активувати ембріональний розвиток та відновити процеси мітотичного дроблення, дає змогу мінімізувати дестабілізуючу дію біотехнологічних факторів, поліпшити умови культивування *in vitro* й підвищити ефективність впровадження у практику тваринництва методів ембріобіотехнології.

1. Кузнєцов В.Є. Вплив клітин гранульози на дозрівання, запліднення та подальший розвиток яйцеклітин корів *in vitro* // Вісн. проблем біології і медицини. — 1999. — Вип. 13. — С. 29–33.

2. Кузнєцова І.Б. Ефективність розвитку *in vitro* зародків великої рогатої худоби, одержаних поза організмом на моношарі клітин BRL // Там само. — 1998. — Вип. 13. — С. 34–37.

3. Мадіч А.В. Доімплантаційний розвиток ранніх ембріонів норок // Вісн. аграр. науки. — 1999. — № 1. — С. 51–53.
4. Стойка Р.С., Кусень С.Н. Полипептидные факторы роста в эмбриогенезе животных // Онтогенез. — 1988. — Т. 3, № 19. — С. 229–239.
5. Гибель замороженно-оттаянных и культивированных вне организма эмбрионов после пересадки / Н.И. Сергеев, Н.А. Лепнова, М.Н. Ефремова, Н.И. Смылова // Зоотехния. — 1996. — № 12. — С. 23–25.
6. A protein spesified by maternal m-RNA in sea urchin eggs that is destroyed at each cleavage division / T. Evans, E.T. Rosenthal, J. Youngblom et al. // Cell. — 1983. — V. 33, N2. — P. 389–396.
7. Bovine nuclear transfer: biochemical characterization of the recipient oocyte cytoplasm / L. Call, T. Dedieu, P. Chesne // Theriogenology. — 1995. — V. 43, N1. — P. 215.
8. Characterization of the embryotrophic activity of exogenous protein-free oviduct-conditional medium used in culture of cattle embryos / P. Mermillod, A. Vasteenbrugge, C. Wils // Biological Reproduction. — 1993. — N49. — P. 582–587.
9. Development capacity and nuclear changes of bovine oocytes from ovaries stored for varied times and temperatures / S. Wang, G.R. Holyoak, Y. Lin, T.D. Bunch // J. Animal Sci. — 1998. — N115. — P. 148–152.
10. Expression of the gap junction gene connexin 43 (C43) in preimplantation bovine embryos derived *in vitro* or *in vivo* / C. Wrenzucki, D. Herrmann, J.W. Carnwath, H. Niemann // J. of Reproduction and Fertility. — 1996. — N108(1). — P. 17–24.
11. Gestational profiles following transfer of cloned bovine blastocysts developed *in vitro* / Y. Heyman, S. Camous, P. Chesne et al. // Theriogenology. — 1995. — V. 43, N1. — P. 234.
12. Immunogistochemical localization and mRNA expression of activin, inhibin, follistatin and activin receptor in bovine cumulus-oocyte complexes during *in vitro* maturation / F. Izadyar, G. Dijkstara, H.T. Van Tol. et al. // Molecular Reprod. & Dev. — 1998. — V. 49, N2. — P. 186–195.
13. Nakao H., Nakatsuji N. Effect of co-culture medium components and gas phase on *in vitro* culture of *in vitro* matured and *in vitro* fertilized bovine embryos // Theriogenology. — 1990. — V. 33, N3. — P. 591–600.
14. Silva C.C., Knight P.G. Modulatory actions of activin A and follistatin on the development competence of *in vitro*-matured bovine oocytes // Biology of Reproduction. — 1998. — V. 58, N2. — P. 558–565.

15. Takahashi S., Tokunaga T., Imai H. Co-culture system using mouse embryonic fibroblast cells for *in vitro* fertilized and nuclear transplanted bovine embryos // Theriogenology. — 1994. — V. 41, N1. — P. 311.

16. Thibodeau J.K., Mayers M.W., Hansel W. Beneficial effects of incubating bovine embryos in groups are due to platelet-derived growth factor // Theriogenology. — 1995. — V. 43, N1. — P. 336.

17. Xia P., Armstrong D.T. Embryonic development of *in vitro* matured and fertilized porcine oocytes after co-culture with estrogen-treated oviductal epithelial cells // Theriogenology. — 1994. — V. 41, N1. — P. 340.

#### **РЕГУЛЯТОРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ РАННЕГО ЭМБРИОНАЛЬНОГО РАЗВИТИЯ. А.В. Мадич**

*Обобщены литературные данные и результаты собственных исследований про регуляторные механизмы раннего эмбрионального развития животных. Показано, что без понимания сложных биологических процессов оо- и эмбриогенеза, внутренних для системы «эмбрион-материнский организм» факторов нельзя создать общие модели (теории) их формирования, а также и разработать современные биотехнологии для управления развитием и поддержания оптимального функционирования биологических объектов *in vivo* и *in vitro*.*

#### **REGULATOR MECHANISMS OF EARLY EMBRYONIC DEVELOPMENT. A.V. Madich**

*Literary information and results of own researches about the regulator mechanisms of early embryonic development of animals is generalized. It is shown that without understanding of difficult biological processes of oogenesis and embryogeny, internal for the system «embryo-mother» of factors it is impossible to create the general models (theories) of their forming, and also and to develop modern to the biotechnology for the management by development and maintenances of the optimum functioning of biological objects of *in vivo* and *in vitro*.*