

2. Мингазов Т.А., Бабышева Л.В. Оплодотворяемость коров при использовании гормональных препаратов//Зоотехния. — 1994. — № 5. — С. 29—30.

3. Сергеев Н.И., Иванов Г.И., Овчинников А.В. Об осеменении коров-доноров с множественной овуляцией//Молочное и мясное скотоводство. — 1979. — № 2. — С. 38—39.

4. Riha J. Oplozenost ovulovaných oocytu pri použití různých režimů inseminace darkyn embryí skotu//Živočišná výroba. — 1988. — R. 33. — S. 5. — S. 427—436.

5. Schiewe M.C., Looney C.R., Johnson C.A. et al. Transferable embryo recovery rates following different insemination schedules in superovulated buf cattle. Theriogenology. — 1987. — V. 28. — № 4. — P. 395—406.

Львівський філіал Інституту розведення  
і генетики тварин УААН

УДК 636.612.646.089.67.6.

А.В. МАДІЧ, І.М. САЄНКО, Л.Є. ШАЛОВИЛО

## РОЗВИТОК ПОЛОВИНОК МИШАЧИХ ЕМБРІОНІВ, ОДЕРЖАНИХ ПОДІЛОМ НА МІКРОМАНІПУЛЯТОРІ ТА ВРУЧНУ

*Викладено результати досліджень по культивуванню половинок мишачих ембріонів з різною клітинною масою. Дана порівняльна характеристика методів мікрохірургії з використанням різноманітних мікроінструментів.*

Метод мікрохірургічного поділу раних ембріонів тварин на половинки та їх трансплантація реципієнтам з метою одержання ідентичних близнюків (клона з двох осіб) апробований, вивчений, удосконалений та впроваджений. Нині ця біотехнологія настільки спрощена, що її можна використовувати в польових умовах без зайвих витрат [6].

Застосування цього методу обмежується критичною кількістю клітин у половинці ембріона, з пониженням якої замість бластоцист з функціонуючою клітинною масою утворюється тільки трофоектодермальна кулька. Очевидно, сигнал, що передає клі-

© А.В. Мадіч, І.М. Сасенко,  
Л.Є. Шаловило, 1999

Розведення і генетика тварин, 1999. Вип. 30

тинна маса сильно зменшеної зиготи материнському організмові, недостатній для утворення ембріонально-материнського зв'язку та імплантації зародка.

Повторний еструс телиць-реципієнтів дав підставу припустити, що після пересадки морфологічно нормальних половинок ембріонів між 25–45 днями тільності гине їх відповідний відсоток [4, 5]. Спроби одержати клони тварин трансплантацією половинок, одержаних багаторазовою бісекцією з 2–4-годинним культивуванням перед повторним поділом, тільки в деяких випадках були успішними [7]. Передчасний лютеолізис пояснювали слабким ембріональним сигналом. Однак у попередніх експериментах окремі половинки ембріонів з пониженою кількістю клітин (1/3 клітинної маси інтактного ембріона подібної стадії розвитку) утворили нормальну тільність, яка закінчилася народженням здорового приплоду [3].

Відомо, що на ранніх стадіях дроблення в зиготі відбуваються процеси диференціації, за які відповідають локалізовані інформаційні системи. З преформованого плазменного середовища виникають дорзальні і вентральні бластомери, які згідно з «внутрішньо-зовнішньою» теорією перетворюються відповідно у трофо- і ембріобласт. Експерименти на мишах показали, що тільки кілька клітин ембріона (у мишок 3–4 клітини зародка) дають розвиток тканинам і органам індивіда. Решта утворюють екстраембріональну мембрану і плаценту.

Отже, крім мінімальної клітинної маси зародка, яка необхідна для формування ембріонально-материнського зв'язку, очевидно має значення морфологічна спрямованість окремих клітин у половинці ембріона.

**Методика досліджень.** Як модельні об'єкти використовували щойно одержані мишачі ембріони в стадії морула і бластоциста. Ембріони вимивали з яйцепроводів евтаназованих самочок через 48, 60 і 72 години після запліднення в результаті гормонально викликаної спонтанної охоти [1]. Після морфологічної оцінки за якістю в експеримент включали тільки ті ембріони, вік яких збігався із стадією розвитку.

Мікрomanipуляції здійснювали в середовищі MEM з допомогою мікрomanipулятора і вручну. Схеми мікрочірургічних методів залежали від форми мікроножів при дистанційному (на manipуляторі) чи ручному поділі, з фіксацією об'єкта чи без [2].

Бісекцію ембріона без фіксації, вручну, здійснювали офтальмічним мікроскальпелем із лазерним заточенням (перша група)

і сапфіровим мікроножем (друга група). Головною вимогою був одноразовий розтин ембріона без утворення клітинних тяжів.

Поділ ембріонів за допомогою мікроманіпулятора здійснювали, використовуючи традиційні мікроінструменти: піпетка для фіксації, мікроніж-сепаратор бластомерів, ін'єкційна мікропіпетка із заточеним під кутом 45° кінчиком.

Після фіксації ембріона зону пелюцида простромлювали завдяки гострокутній конфігурації сталевого мікроножа і поступовими рухами вперед розділяли масу бластомерів на дві половини. Загострений кут ін'єкційної піпетки забезпечив атравматичне видалення однієї із половин і її підсадку в донорську оболонку (використовували незапліднені ооцити мишок).

Половинки ембріонів, що були отримані цим методом, склали третю групу.

Життєздатність половинок мишачих ембріонів оцінювали візуально за рекомпактизацією клітинної маси після двогодинного культивування в газовому середовищі з 5% CO<sub>2</sub> при температурі +37,5° С, максимальній вологості повітря.

**Результати досліджень.** В експеримент було включено 45 морфологічно нормальних морул і бластоцист, які умовно поділили на три групи, по 15 ембріонів у кожній (див. табл.).

Показник	Усього	Перша група	Друга група	Третя група
Одержано доброякісних ембріонів	67			
з них включено в експеримент	45	15	15	15
Отримано доброякісних половинок ембріонів	71 (79%)	24 (82%)	21 (69%)	26 (88%)
Компактизувались половинки після 2-4 годин культивування	53	12	17	24

В результаті бісекції ембріонів з використанням різної техніки, інструментів і методів поділу було отримано 82%, 69% і 88% доброякісних половинок у першій, другій і третій групах відповідно. Причому в третій групі половинки перебували в оболонках, тоді як у половинок першої і другої груп зони пелюцида були частково зруйновані мікроскальпелем або відсутні.

Двогодинне культивування в поживному середовищі Ham's F10 показало, що більші половинки ембріонів і ті, які мали цілу або деформовану оболонку, регенерували і компактизувались, а ті, що умовно дорівнювали 1/3 або менше маси інтактного ембріона, дегенерували. Однак у третій групі дві половинки ембріонів з клітинною масою, меншою 1/2 цілого ембріона, відповідали вимогам якісної оцінки. Очевидно, при подальшому культивуванні *in vivo* або *in vitro* та за відповідних сприятливих умов вони могли би відновити дроблення і продовжити розвиток.

## Висновки.

1. Для одержання якісних половинок ембріонів методом бісекції можливе використання офтальмічного мікроскальпеля і сапфірового мікроножа.

2. Кращий результат досягається при бісекції ембріонів простромлюванням оболонки і внутрізоняльним поділом маси бластомерів з підсадкою половинок ембріонів у зони пелюцида.

3. Половинки ембріонів з клітинною масою, меншою  $1/3$  маси цілого ембріона, як правило, нежиттєздатні. Вони неспроможні до рекомпактизації і відновлення функції дроблення, а ті, що за морфологією оцінені як доброякісні, потребують підсилюючої дії додаткового ростового фактора.

4. Ембріони навіть з мінімальною клітинною масою можуть вмщати достатньо життєздатних клітин для проліферації і реорганізації у повноцінні ембріони.

1. Дыбан А.П., Секирина Т.Г. Изучение доимплационного развития однойцевых близнецов: Опыт на зародышах мышей// Онтогенез. — 1981. — Т. 12. — № 2. — С. 130—139.

2. Клецко Н.Г., Магич А.В. Основы микроманипуляции с эмбрионами животных//Бюл. науч. работ ВИЖ. — 1988. — № 89. — С. 44—47.

3. Магич А.В. Разделение эмбрионов методом микрохирургии и получение однойцевых и химерных телят при нехирургической пересадке: Автореф. канд. дис. ... канд. биол. наук. — Дубровицы, 1988. — 28 с.

4. Сергеев Н.И., Некрасов А.А., Смыслова Н.И. Эндокринные аспекты механизма материнского опознания беременности в связи с приживляемостью эмбрионов при трансплантации//Сельскохозяйственная биология. — 1986. — № 13. — С. 11—18.

5. Сергеев Н.И., Лепнова Н.А., Ефремова М.Н., Смыслова Н.И. Гибель заморожено-оттаянных и культивированных вне организма эмбрионов после пересадки//Зоотехния. — 1996. — № 12. — С. 23—25.

6. Baker R.D., Shea B.F. Commercial splitting of bovine embryos//Theriogenology. — 1985. — V. 23. — W 1. — P. 1—12.

7. Willadsen S.M., Polge C. Attempts to produce monozygotic quadruplets in cattle by blastomere separation//Vet. Rec. — 1981. — V 108. — W 10. — P. 211—213.

Львівський філіал Інституту розведення  
і селекції тварин УААН