

636

Д40

Джамалова Г.А.



Биотехнология

ЖИВОТНЫХ

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ РЕСПУБЛИКИ КАЗАХСТАН

636
Д 40

ДЖАМАЛОВА Г.А.

БИОТЕХНОЛОГИЯ ЖИВОТНЫХ

**Агентство "Маматай"
Алматы – 2004**

45.2 973

Д 40
ББК 45.2 Я73
Д40

Рецензенты:

Курбанова Г.В. – доктор биологических наук, профессор кафедры гистологии Казахского Национального Медицинского Университета им. С.Асфендиярова.

Мирзабеков С.Ш. – доктор сельскохозяйственных наук, доктор биологических наук РФ, профессор кафедры животноводства и племенного дела Казахского Национального Аграрного Университета.

*Рекомендовано Министерством образования
и науки Республики Казахстан*

Д40 Биотехнология животных, Джамалова Г.А., кандидат сельскохозяйственных наук, доцент кафедры селекции и биотехнологии животных КазНАУ - Алматы, 2004 – 304 с.

(Учебники для высших сельскохозяйственных учебных заведений).

ISBN 9965-25-347-1

В учебнике рассматриваются биотехнологические аспекты разведения сельскохозяйственных животных. При этом особое внимание уделяется методам биотехнологии, которые способствуют ускоренному размножению ценных генотипов животных путем эмбриотрансплантации (суперовуляция и осеменение самок-доноров, трансплантация эмбрионов животных), эмбриокультуры (культивирование гамет и эмбрионов, экстракорпоральное оплодотворение, криоконсервация гамет и эмбрионов, селекция гамет и эмбрионов) и эмбриоинженерии (рекомбинантная ДНК, трансгенез, клонирование).

Учебник предназначен для студентов, магистрантов, аспирантов и преподавателей сельскохозяйственных и биологических ВУЗов.

ISBN 9965-25-347-1

ББК 45.2 Я73

3705000000-001
001051-04

2004 без объявл.

© Г.А. Джамалова 2004
Агентство "Маматай" 2004

СОДЕРЖАНИЕ

Предисловие	7
ВВЕДЕНИЕ. БИОТЕХНОЛОГИЯ, КАК МУЛЬТИДИСЦИПЛИНАРНАЯ НАУКА	9
Глава 1. БИОТЕХНОЛОГИЯ: ПРЕДМЕТ И МЕТОДЫ	9
1.1 Предмет и объект исследования	10
1.2 Биотехнологический резерв животных	10
1.3 Методы биотехнологии в животноводстве	12
1.4 Биотехнология и ее связь с другими науками	18
1.5 Биотехнология: зарождение, становление и развитие	19
Резюме	22
Контрольные вопросы	23
Рекомендуемая литература	24
ЧАСТЬ I. ОСНОВЫ ЛАБОРАТОРНОГО ДЕЛА В БИОТЕХНОЛОГИИ	25
Глава 2. ОРГАНИЗАЦИЯ РАБОТЫ ЛАБОРАТОРИИ ПО БИОТЕХНОЛОГИИ В ЖИВОТНОВОДСТВЕ	25
2.1 Требования к учебным лабораториям	26
2.2 Организация работы лаборатории	26
2.3 Оборудования лаборатории	29
2.4 Лабораторный инвентарь	31
Резюме	33
Контрольные вопросы	34
Рекомендуемая литература	34
Глава 3. ПРАВИЛА РАБОТЫ С ЛАБОРАТОРНЫМ ИНВЕНТАРЕМ	35
3.1 Правила хранения лабораторного инвентаря	35
3.2 Мытье лабораторного инвентаря	36
3.3 Сушка лабораторного инвентаря	37
3.4 Стерилизация лабораторного инвентаря	38
Резюме	40
Контрольные вопросы	41
Рекомендуемая литература	41
Глава 4. ЖИВОТНЫЕ, КАК ОБЪЕКТ ИССЛЕДОВАНИЯ	41
4.1 Лабораторные животные, как объект исследования	42
4.2 Сельскохозяйственные животные, как объект исследования	44
Резюме	45
Контрольные вопросы	45
Рекомендуемая литература	46

Глава 5. ЛАБОРАТОРНОЕ ДЕЛО В БИОТЕХНОЛОГИИ	46
5.1 Этапы работ по биотехнологии в условиях учебной лаборатории	46
5.2 Метод лапаротомии	48
5.3 Витальный метод изучения репродуктивных клеток животных	53
Резюме	59
Контрольные вопросы	60
Рекомендуемая литература	60
ЧАСТЬ II. ЭМБРИОТРАНСПЛАНТАЦИЯ	61
Глава 6. ОСНОВЫ БИОЛОГИИ РАЗМНОЖЕНИЯ ЖИВОТНЫХ	61
6.1 Репродуктивная система самок животных	62
6.2 Репродуктивный аппарат самцов животных	65
6.3 Физиология половой системы самок животных	66
Резюме	70
Контрольные вопросы	72
Рекомендуемая литература	72
Глава 7. ОТБОР ЖИВОТНЫХ И ПОДБОР МАТЕРЕЙ	73
7.1 Отбор самцов-производителей и самок-доноров	74
7.2 Отбор реципиентов. Подбор матерей: мать-донор и мать-реципиент	75
7.3 Методы количественной биологии в биотехнологии	78
Резюме	78
Контрольные вопросы	79
Рекомендуемая литература	79
Глава 8. СУПЕРОВУЛЯЦИЯ И ОСЕМЕНЕНИЕ САМОК- ДОНОРОВ	79
8.1 Суперовуляция самок-доноров	82
8.2 Норма овуляции и уровень суперовуляции	90
8.3 Синхронизация охоты	94
8.4 Осеменение самок-доноров	96
Резюме	98
Контрольные вопросы	90
Рекомендуемая литература	100
Глава 9. ТРАНСПЛАНТАЦИЯ ЭМБРИОНОВ ЖИВОТНЫХ	101
9.1 Вымывание эмбрионов	102
9.2 Выход эмбрионов от суперовулированных доноров	113
9.3 Пересадка эмбрионов	114
9.4 Взаимодействие между донорами, эмбрионами, реципиентами и трансплантатами	118
9.5 Научно-исследовательская работа кафедры «Селекция и биотехнология животных» КазНАУ	120

Резюме	131
Контрольные вопросы	132
Рекомендуемая литература	133
ЧАСТЬ III. ЭМБРИОКУЛЬТУРА	134
Глава 10. ОСНОВЫ КЛЕТОЧНОЙ БИОЛОГИИ	134
10.1 Клетка – элементарная единица живого	135
10.2 Биологическая сущность соматической клетки животных	136
10.3 Биологическая сущность гамет животных	139
10.4 Культивирование гамет <i>in vivo</i>	141
10.5 Фолликулогенез и овуляция	146
10.6 Атрезия фолликула	152
10.7 Физиологические предпосылки для оплодотворения гамет	153
10.8 Оплодотворение гамет	156
10.9 Культивирование эмбрионов <i>in vivo</i>	159
Резюме	163
Контрольные вопросы	164
Рекомендуемая литература	164
Глава 11. КУЛЬТИВИРОВАНИЕ, ОЦЕНКА, СЕЛЕКЦИЯ И ОТБОР ГАМЕТ И ЭМБРИОНОВ	165
11.1 Оценка гамет и эмбрионов	165
11.2 Селекция и отбор гамет и эмбрионов	176
11.3 Культивирование гамет	183
11.4 Оплодотворение гамет <i>in vitro</i>	187
11.5 Культивирование эмбрионов	193
11.6 Клеточный анализ в животноводстве	195
Резюме	197
Контрольные вопросы	199
Рекомендуемая литература	200
Глава 12. КРИОБАНК ГАМЕТ И ЭМБРИОНОВ	200
12.1 Основы криобиологии	200
12.2 Криоконсервация	203
Резюме	212
Контрольные вопросы	212
Рекомендуемая литература	213
ЧАСТЬ IV. ЭМБРИОИНЖЕНЕРИЯ	214
Глава 13. ОСНОВЫ МОЛЕКУЛЯРНОЙ БИОЛОГИИ	214
13.1 Структура ДНК по Д. Уотсону и Ф. Крику	215
13.2 Репликация ДНК	218

13.3	Расшифровка генетической информации	220
13.4	Транскрипция	221
13.5	Трансляция	225
	Резюме	230
	Контрольные вопросы	230
	Рекомендуемая литература	231
Глава 14. РЕКОМБИНАНТНАЯ ДНК		232
14.1	Рекомбинантная ДНК	232
14.2	Ферменты-рестрикты	235
14.3	Векторы клонирования	237
14.4	Химический синтез ДНК	241
14.5	Секвенирование ДНК	246
14.6	Полимеразная цепная реакция	249
14.7	Рекомбинантный белок	250
	Резюме	251
	Контрольные вопросы	252
	Рекомендуемая литература	253
Глава 15. КЛЕТочНЫЕ ТЕХНОЛОГИИ В ЖИВОТНОВОДСТВЕ		255
15.1	Трансгенные животные	255
15.2	Трансплантация ядер в энуклеированные яйцеклетки	267
15.3	Клонированные животные	270
15.4	Химерные животные	277
	Резюме	280
	Контрольные вопросы	281
	Рекомендуемая литература	281
Биотехнологический словарь		284
Литература		296

Предисловие

Скорость генетического улучшения, которая может быть достигнута в племенных программах повышения воспроизводительной способности животных, имеет в настоящее время большое теоретическое и практическое значение.

В данное время возникает острая потребность изучения вопросов физиологии генетической изменчивости и биологических критериев воспроизводительных качеств у животных. Это сравнительно новое и быстро развивающееся направление в генетике и биотехнологии животных. Выявление признаков, по которым можно предсказать генотип у животных по физиологическим параметрам представляет большой научный интерес. Понимание механизма, контролирующего рост, развитие и созревание овулирующих фолликулов, оплодотворение гамет и эмбриональное развитие плода, могло бы способствовать выявлению селекционных критериев генетического улучшения воспроизведения, что очень ценно для разработки новых приемов наследственно обусловленного повышения плодовитости животных. Селекционные аспекты разведения во многом определяются процессами, способствующими регулированию биологических качеств животных. И не секрет, что одним из основных путей регулирования этих процессов является биотехнология.

В основу методов биотехнологии легли теоретические разработки по искусственному осеменению, гормональному регулированию воспроизводительной функции, трансплантации эмбрионов у животных. Перспективы использования методов биотехнологии в практике разведения животных столь грандиозны, что уже сегодня в ряде стран эти исследования поставлены на коммерческую основу. В зоотехнии по биотехнологии животных в данном направлении сделан огромный прогресс.

Учебный материал в книге дается в строгом соответствии с требованиями высшей школы и перечнем правил, содержащихся в ней (Типовая учебная программа «Эмбриоинженерия», 2003 год; типовая учебная программа «Биотехнология животных», 2001 год, предназначенные для студентов специальностей «Селекция и биотехнология в животноводстве», «ТППЖ», «Охотоведение и звероводство»).

Учебник «Биотехнология животных» состоит из четырех частей: основы лабораторного дела, эмбриотрансплантации, эмбриокультуры и эмбриоинженерии. В учебнике подробно изложены вопросы воспроизводительной, клеточной и молекулярной биотехнологии. При этом учебный материал излагается таким образом, чтобы помочь обучающемуся изучить основные методы биотехнологии в животноводстве.

Мною, как автором, не ставилась задача детально излагать всю имеющуюся по биотехнологии информацию в одном учебнике. Поэтому для изучения дисциплины «Биотехнология животных» подготовлены учебник «Биотехнология животных» и учебное пособие «Практикум по биотехнологии живот-

ных». Именно в комплексе они помогут студенту изучить предмет и освоить основные методы биотехнологии, применяемые в животноводстве.

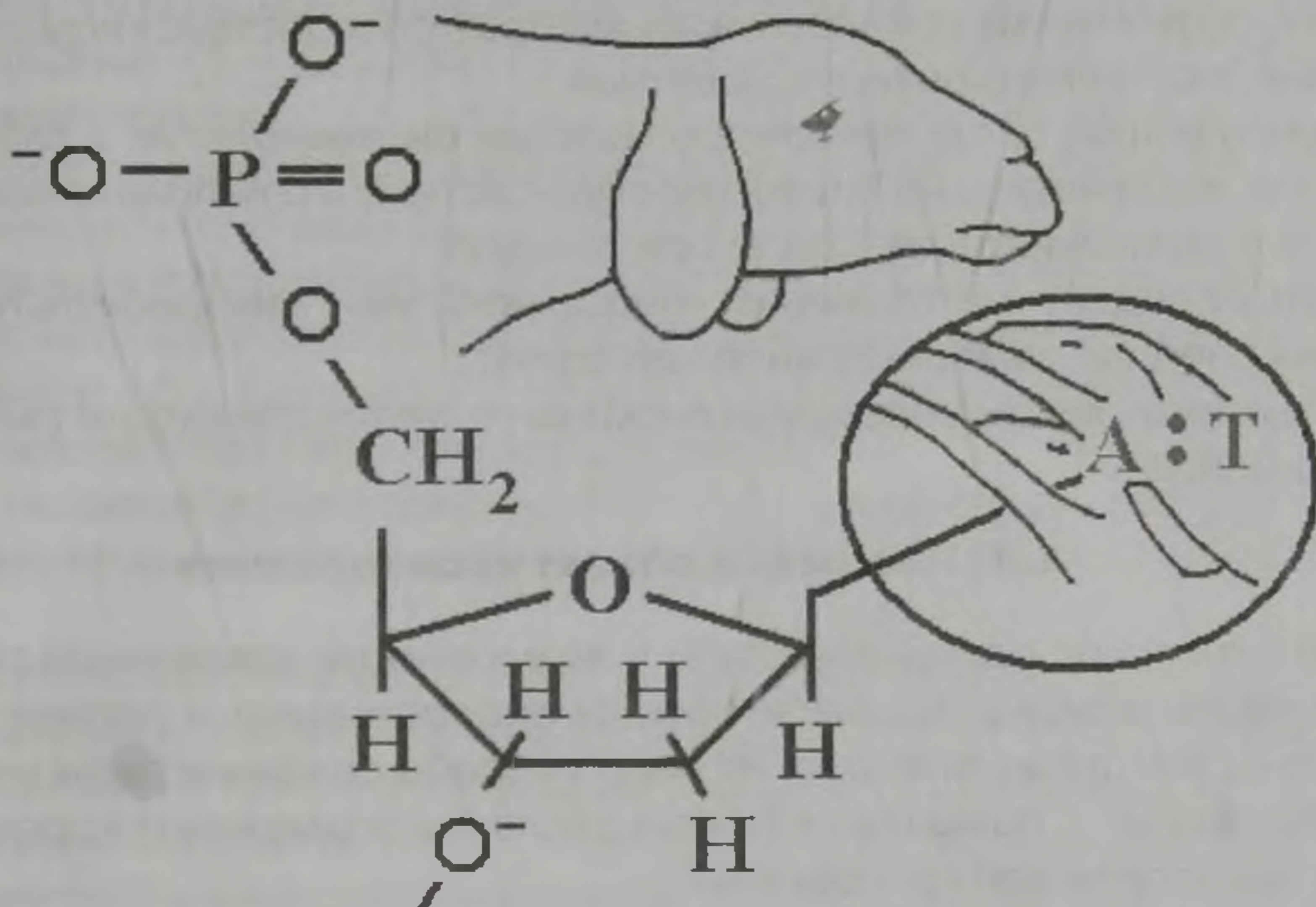
В этом учебнике излагаются теоретические аспекты биотехнологии, а в учебном пособии раскрываются основные «классические» методы биотехнологии, проводимые на уровне эмбриона животных при их трансплантации (макротехнологии) и даны ценные рекомендации по применению методов количественной биологии в биотехнологии.

На изучение предмета «Биотехнология животных» отводится три кредита: первый кредит на лекционный, второй – на лабораторный и третий – на практический курсы. Учебник вместе с практикумом координирует работу обучающегося таким образом, чтобы помочь ему не только освоить теоретический курс и овладеть практическими навыками данной дисциплины, но и помочь выразить свои творческие способности, приобрести навыки своего свободного профессионального критического мышления, умения аргументировать и отстаивать свои позиции и инициативность. Для реализации своих творческих возможностей студенту активную помощь окажут разработанные в практикуме задания для самостоятельной аудиторной и внеаудиторной работы. Следует отметить, что большое внимание в разработанных учебных материалах уделяется именно самостоятельной работе (СРОП, СРО). Поэтому задача предлагаемого учебника заключается в том, чтобы помочь студенту освоить основные методы биотехнологии не только в аудиторных, но и во вне аудиторных условиях. Предлагаемый учебник был апробирован в течение 2000-2003 учебных годов и получил положительные отзывы со стороны студентов и преподавателей. Данный учебник вместе с практикумом является незаменимым помощником не только для студентов, но и для магистрантов, аспирантов и преподавателей ВУЗов биологического и сельскохозяйственного профилей.

Желаю удачи!

Автор Джамалова Г.А

ВВЕДЕНИЕ: БИОТЕХНОЛОГИЯ, КАК МУЛЬТИДИСЦИПЛИНАРНАЯ НАУКА



Ультрасовременным этапом научно-технического прогресса является биотехнология, которая как наука возникла на стыке молекулярной и клеточной биологии и микробиологии.

Биотехнология обещает коренным образом изменить способы решения кардинальных проблем здравоохранения, охраны окружающей среды, многих сфер промышленного производства, обеспечения общества продовольствием. И не удивительно, что на сегодня приемы и методы биотехнологии внедрены в различные сферы научной и производственной деятельности человека, начиная молекулярными и заканчивая космическими исследованиями.

Биотехнология – это наука, которая с помощью научных и технических принципов «корректирует» биологическую систему в гуманных для человека целях.

Благодаря биотехнологии стало возможным применение биохимических и генетических свойств живых организмов в практических целях. Поэтому прогрессивные идеи в биотехнологии находятся в прямой зависимости как от прогресса фундаментальных исследований в биологии при познании механизмов, происходящих в живой клетке, так и развития биологической техники.

Глава 1. Биотехнология: предмет и методы

Цель. Ознакомиться с объектами исследования и историей развития биотехнологии, получить общее представление о биотехнологии животных и применении ее методов в животноводстве.

После изучения главы студент сможет:

- охарактеризовать становление биотехнологии как науки;
- дать разъяснение предпосылкам, которые способствуют использованию биотехнологического резерва животных;
- иметь общее представление о методах биотехнологии в зависимости от уровня воздействия на биологическую систему и о направлениях биотехнологии в зависимости от сферы применения;
- дать определение терминам «биотехнология», «эмбриокультура», «эмбриоинженерия», «эмбриотрансплантация»;
- объяснить, каким образом экономика является движущим рычагом для биотехнологии.

1.1. Предмет и объект исследования

Биотехнология раскрывает пути и возможности извлечения генетического резерва в виде биохимических, физиологических и регенерирующих возможностей организма, а также ищет способы создания таких методических разработок, с помощью которых стало бы возможным корректировка любой биологической программы.

Объектами исследования в биотехнологии являются представители основных групп живых организмов – это вирусы, бактерии, растения и животные, а также изолированные из них молекулы, клетки и субклеточные компоненты. Предметом изучения являются биотехнологические ресурсы, заложенные в живой системе. К биотехнологическим ресурсам животных можно отнести: молекулярный (структура и свойства гена), физиологический (банк гамет, предимплантационное развитие, тотипотентность) и селекционный (совершенствование племенного ядра; создание новых пород) резервы. Поэтому биотехнология базируется на протекающих в этих живых системах физико-химических, биохимических и физиологических процессах, в результате которых происходит выделение энергии, синтез и деградация продуктов, формирование организованных структур.

1.2. Биотехнологический резерв животных

Предпосылками для внедрения методов биотехнологии в животноводство послужили следующие биологические особенности млекопитающих (рис.1.1.):

1. Биологический банк гамет у животных. Биологический банк гамет у животных локализован в гонадах. Морфогенетический потенциал гамет настолько огромен, что например, к моменту рождения в яичниках овец содержится примерно 700 тысяч фолликулов; к половому созреванию их остается примерно от 12000 до 86000 мелких фолликулов и от 100 до 400 более крупных развивающихся фолликулов. Подобная динамика популяций ооцитов характерно и для других видов самок млекопитающих. Для самцов отмечается еще большее содержание сперматозоидов в семенниках. За весь репродуктив-

ный период у самцов образуется, в среднем, 280 – 450 трлн. сперматозоидов. Так, только в 1 мл спермы их содержится, например у барана, 1,8 – 3,4 млрд. Из такого большого запаса в воспроизводстве участвуют, в среднем, для одноплодных – 5 – 10, а для многоплодных – 40 – 80 пар гамет (яйцеклеток и сперматозоидов).

2. Предимплантационное развитие эмбрионов животных. После оплодотворения эмбрион от стадии зиготы до стадии гастрюлы в гениталиях самки млекопитающих находится в свободном состоянии. Путь от места оплодотворения до места имплантации занимает, в среднем, у свиней – 2 – 3, овец – 4 – 5, кроликов – 5 – 7 и коров – 7 – 8 дней. При этом, эмбрион до имплантации развивается в прочной с биологической точки зрения оболочке, названной зоной пеллюцида (*zone pellucid*). Благодаря этому стало возможным проведение различных микроманипуляций с эмбрионами животных в условиях *in vitro*.

3. Рождение однояйцовых близнецов у одноплодных животных. Однояйцовые близнецы рождаются благодаря тому, что в период предимплантационного развития по причине нарушения целостности *zone pellucid* происходит разделение эмбриона, что способствует формированию двух (реже трех – пяти) самостоятельных зародышевых путей развития. Такие близнецы идентичны по всем генетическим и биохимическим параметрам, т.к. их родоначальником является одна оплодотворенная яйцеклетка. Благодаря этому явлению (тотипотентность) стало возможным получение биологических копий (биокопий) на уровне многоклеточных организмов, что имеет большое значение для племенного животноводства.

4. Создание и совершенствование племенного ядра в животноводстве. При содержании и разведении сельскохозяйственных животных различают племенное ядро и пользовательное стадо. Для отнесения в племенное ядро животное должно отвечать следующим требованиям: быть физиологически здоровым, иметь высокое воспроизводительное качество, обладать ценным генотипом и проверено по качеству потомства. В биотехнологических исследованиях к этой группе животных относят доноров и производителей. *Донор* – это самка, от которой получают генетически ценные ооциты и эмбрионы; *производитель* – это самец, покрывающий самку-донор. Следовательно, именно эта категория животных принимает активное участие в воспроизводстве стада.

Стадо пользовательных животных – это животные, обладающие менее ценным генотипом, но обязательно физиологически здоровые и имеющие хорошие воспроизводительные качества. К этой категории относят реципиентов. *Реципиент* – это самка, вынашивающая чужой плод. К пользовательным животным относят также *пробников* (самцы, используемые для выведения самок в охоте), для которых достаточно иметь хорошее физиологическое здоровье.

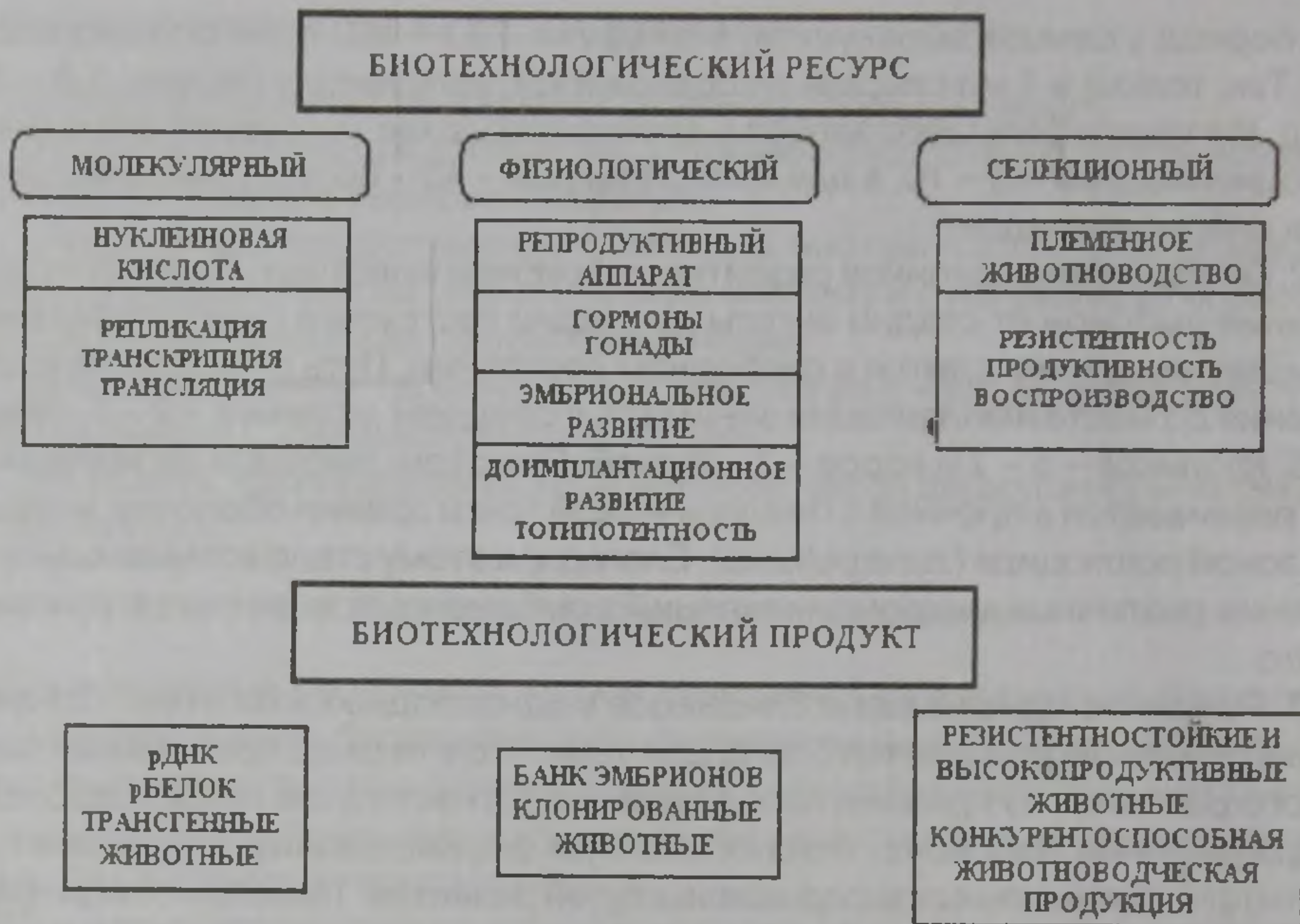


Рисунок 1.1. Биотехнологический резерв животных.

В целом, биотехнологический резерв сельскохозяйственных животных определяется биологическими особенностями млекопитающих. Известно, что все биологические качества вида регулируются наследственным материалом. Поэтому, выявление и использование генетического резерва для биотехнологических целей называют *биотехнологическим ресурсом* (резервом).

Из всего вышеизложенного следует, что по применению биотехнологический резерв животных условно можно разделить на три класса (рис. 1.1):

- 1) молекулярный ресурс – выражается через структуру и свойства гена;
- 2) физиологический ресурс – раскрывается через банк гамет, предимплантационное развитие эмбрионов (тотипотентность);
- 3) селекционный ресурс – связан с племенным животноводством и характеризуется совершенствованием племенного ядра, созданием новых пород.

1.3. Методы биотехнологии в животноводстве

В зависимости от уровня воздействия человека на биологическую систему биотехнология может быть *молекулярной*, основанной на технологии рекомбинантной ДНК и технологии микроорганизмов и *клеточной*, осуществляющей микроманипуляции на уровне ядер и клеток (табл. 1.1).

Таблица 1.1. Методы биотехнологии в зависимости от уровня воздействия на биологическую систему

№	Метод	Цель	Объект исследования	Конечный продукт
1	Молекулярная	Изменение генетической программы клетки и организма в целом	Молекула ДНК и РНК	Рекомбинантная ДНК; трансгенный организм
2	Клеточная	Получение животных и растений с необычными и полезными для человека свойствами	Клетка животных и растений	Клонированный, химерный организм

В зависимости от сферы применения этих методов биотехнология может быть космической, экологической, медицинской, сельскохозяйственной и промышленной (рис. 1.2.).

Сельскохозяйственную биотехнологию делят, в свою очередь, на биотехнологию растений и биотехнологию животных.

Биотехнология животных – эта наука, которая с помощью методов молекулярной и клеточной биотехнологии производит «корректировку» гено-типа, обеспечивая создание скороспелых резистентно стойких и высокопродуктивных животных.

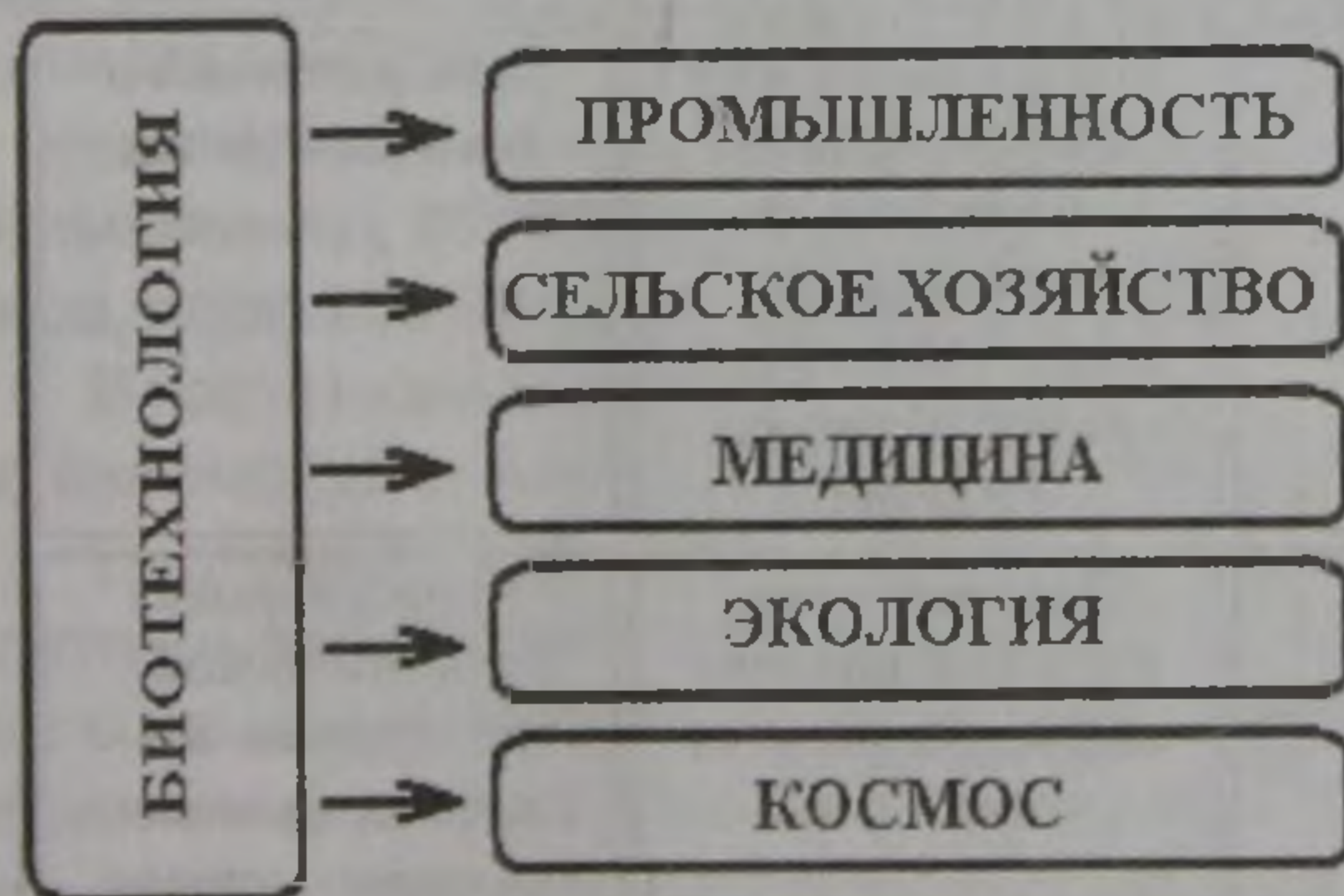


Рисунок 1.2. Биотехнология: сфера влияния.

Для раскрытия и применения биотехнологических ресурсов в животноводстве используют биотехнологию молекулярную, клеточную и биотехнологию воспроизводства (табл. 1.2.).

Биотехнология воспроизводства животных – метод использования репродуктивного резерва животных для их ускоренного размножения с целью улучшения генетического потенциала.

Биотехнология воспроизводства открывает огромные возможности в разведении животных как с точки зрения повышения эффективности племенной работы, так и увеличения воспроизводительных свойств организма.

Благодаря методам биотехнологии воспроизводства мы можем воздействовать на популяцию. Предметом изучения для биотехнологии воспроиз-

водства является репродуктивное качество животных, а объектами для исследования: 1) гормональный статус организма животных, выражающийся через гормоны репродукции и выявляющийся через взаимодействие между гипоталамусом, гипофизом и гонадами; 2) морфологическая и физиологическая сущность органов размножения.

В биотехнологии воспроизводства различают следующие методы:

1. Суперовуляция – метод гормонального воздействия на самку - донор, обеспечивающий рост и развитие дополнительного числа фолликулов.

2. Искусственное осеменение – это мероприятие, направленное на использование семени высокопродуктивных производителей для поголовного покрытия самок с целью масштабного улучшения генотипа животных.

Таблица 1.2. Биотехнология животных: основные направления при влиянии на популяцию							
Методы	Биотехнология воспроизводства		Биотехнология клеточная	Биотехнология молекулярная			
		Суперовуляция	Искусственное осеменение	Трансплантация эмбрионов	Эмбриональные исследования в животноводстве	Клеточные технологии в животноводстве	Генетическая инженерия
Предмет изучения	Репродуктивное качество животных		Биологическая сущность клетки	Биологическая сущность гена			
Объект исследования	Репродуктивная система, популяция		Клетка животного происхождения, гаметогенез, оплодотворение, предимплантационное развитие эмбрионов	ДНК различного происхождения			
Цель	Ускоренное размножение ценных генотипов животных		Получение животных с новыми наследственными свойствами	Корректировка генетической программы животных на молекулярном уровне			
Глобальная задача	Развитие племенного животноводства путем создания скороспелых животных с повышенной резистентностью						
Методологическая задача	Расширение и углубление масштабов воздействия научно-технического прогресса на организм животного на молекулярном и клеточном уровнях						

В результате достижений в генетике и технологии искусственного осеменения животноводы получили мощное средство совершенствования животных, расширились возможности отбора производителей с высоким генетическим потенциалом продуктивности, ускорились темпы генетического улучшения целых популяций. Поэтому в процессе совершенствования поголовья резко возросла роль производителей. Сейчас потомство генетически ценных производителей при искусственном осеменении может насчитывать до нескольких десятков тысяч голов.

3. Трансплантация эмбрионов – это метод переноса эмбриона от самки-донора в самку - реципиент. Цель трансплантации в животноводстве – это использование генетического резерва высокопродуктивных самок животных.

Благодаря методу трансплантации эмбрионов расширились биологические возможности воспроизводства самок, т.к. в их яичниках содержится огромный запас яйцеклеток. Для более полного использования этого огромного генетического потенциала проведены исследования, направленные на реализацию возможности трансплантации ранних эмбрионов от выдающихся матерей в матку самок с нормальным воспроизводительным циклом, но с низкой генетической ценностью.

Данная технология позволяет:

- 1) резко увеличить число потомков от одной высокопродуктивной самки;
- 2) осуществлять транспортировку и длительное хранение организмов в виде гамет и эмбрионов;
- 3) путем отбора гамет и эмбрионов получать потомков желательного пола и с желательными физиолого-биохимическими свойствами.

Для осуществления всех перечисленных технологий необходимо использовать комплекс мероприятий, конечной целью которых является трансплантация эмбрионов.

В целом, вся технология по воспроизводству включает в себя следующие этапы работ: отбор доноров, производителей и реципиентов, супероуляция доноров и синхронизация охоты между половыми циклами донора и реципиентов, осеменение доноров (естественная случка, искусственное осеменение), вымывание эмбрионов, оценка качества извлеченных эмбрионов, пересадка эмбрионов в гениталии реципиентов.

В настоящее время биотехнология воспроизводства животных очень тесно взаимодействует с биотехнологией молекулярной и клеточной.

Биотехнология клеточная – это наука, которая занимается различными клеточными микроманипуляциями, в результате которых получают организмы с ценными биологическими свойствами. В животноводстве основным объектом для исследования является репродуктивная клетка животных. Биотехнология клеточная в животноводстве включает в себя два взаимодополняющих научных направления:

1. Эмбриокультуральные исследования (эмбриокультура), направленные на создание для изолированных клеток (гамет и эмбрионов) таких условий, при которых они сохраняют не только жизнедеятельность, но и способность к развитию.

Основные задачи для эмбриокультуральных исследований: 1) селекция гамет и эмбрионов; 2) культивирование гамет и эмбрионов; 3) экстракорпоральное оплодотворение гамет; 4) создание банка гамет и эмбрионов; 5) создание и совершенствование питательных сред.

2. Клеточные технологии, которые проводятся на уровне ядер и клеток с целью создания ценных «сконструированных» генотипов животных.

Основными задачами клеточных технологий в животноводстве являются: 1) соматическая гибридизация; 2) клонирование; 3) создание химерных животных.

Биотехнология молекулярная – это наука, с помощью которой осуществляется «коррекция» наследственности на молекулярном уровне с целью получения новых генетических программ в животном организме. Основным объектом для исследования является нуклеиновая кислота (молекула ДНК и РНК). Биотехнология молекулярная включает в себя два раздела:

1. Генетическая инженерия – имеет отношение только к отдельному гену (или генам). Основными задачами генетической инженерии являются: 1) синтез или выделение генов и их модификация; 2) конструирование и клонирование рекомбинантных молекул; 3) создание банка генов (библиотеки генома).

2. Генетическая трансформация – имеет отношение к процессу переноса генов.

Основные задачи: 1) введение гена в реципиент; 2) отбор и анализ трансформантов; 3) интеграция и экспрессия генов; 4) создание продуцентов ценных веществ и трансгенных животных.

Последовательность работ по биотехнологии в животноводстве определяется тесной взаимозависимостью между этими тремя методами. Так, для того чтобы получить в животноводстве генетически ценные эмбрионы необходимо применить методы воспроизводительной биотехнологии (суперовуляция, осеменение, вымывание эмбрионов), далее полученные эмбрионы после селекции можно подвергнуть молекулярным (трансгеноз) или клеточным (клонирование) микроманипуляциям. Затем «сконструированным» эмбрионам необходимо создать «реанимационные» условия *in vitro*, после чего оценить их по качеству (клеточная селекция), а в завершении – пересадить в гиниталии реципиентов (трансплантация) для получения генетически ценного потомства.

Как видно из перечисленных работ, современная биотехнология в животноводстве проводит различные эксперименты именно с эмбрионами животных. Целью такой работы является изменение биологической программы животных. Данная корректировка возможна лишь на уровне предимплантационного эмбриона. Эмбрион, претерпевший «биокорректировку» с целью дальнейшего развития трансплантируется в репродуктивный аппарат физиологической матери.

Таким образом, молекулярная биотехнология, клеточная биотехнология и биотехнология воспроизводства привели к образованию новых научных направлений в животноводстве – эмбриоинженерию, эмбриокультуру и эмбриотрансплантацию, которые изучают и раскрывают возможности выявляе-

ния и использования биотехнологических ресурсов животных, заложенных в гаметях, эмбрионах и в самих организмах (табл. 1.3.).

Эмбриоинженерия – это метод биотехнологии в животноводстве, направленный на изыскание путей и возможностей извлечения из животного организма генетического ресурса и основанный на применении методов молекулярной и клеточной биотехнологии с целью получения генетически “сконструированных” человеком и экономически рентабельных организмов.

Эмбриокультура – это метод биотехнологии в животноводстве, направленный на изыскание путей и возможностей извлечения физиологического ресурса из гамет и эмбрионов животных и основанный на сохранении у них процессов жизнедеятельности и обеспечении им благоприятных условий развития *in vitro* и *in vivo*.

Таблица 1.3. Методы биотехнологии в животноводстве

Таблица 1.3. Методы биотехнологии в животноводстве			
Биотехнология животных	Методы		
	Эмбриотрансплантация	Эмбриокультура	Эмбриоинженерия
Предмет изучения	Воспроизводительная система	Клетки репродукции, эмбрионы	Генетический ресурс
Селекционный резерв животных			
Объект исследования	Взаимосвязь между самками-донорами, эмбрионами, самками-реципиентами и трансплантатами.	Взаимосвязь между гипоталамусом, гипофизом и гонадами при гаметогенезе, оплодотворении и предимплантационном развитии эмбриона	Взаимосвязь между микро - и макроорганизмом на молекулярном уровне.
Цель	Ускоренное размножение ценных генотипов животных.	Сохранение генофонда животных	Создание генетически запрограммированных организмов животных.
Методы	Суперовуляция Синхронизация охоты. Трансплантация эмбрионов.	Культивирование, оценка, селекция, отбор гамет и эмбрионов. Экстракорпоральное оплодотворение гамет. Криоконсервация.	Трансгенез. Клонирование.

Эмбриотрансплантация – это метод биотехнологии в животноводстве, направленный на изыскание путей и возможностей извлечения физиологического ресурса из репродуктивной системы животных и основанный на применении метода трансплантации эмбрионов с целью ускоренного размножения ценных генотипов.

В комплексе, методы эмбриоинженерии, эмбриокультуры и эмбриотрансплантации в животноводстве обеспечивают раскрытие селекционного, т.е. генетического резерва животных.

1.4. Биотехнология и ее связь с другими науками

Новые научные направления не возникают исключительно на собственных методах. Они формируются путем объединения знаний из различных областей науки. Биотехнология как наука не является исключением, так как она включает в себя знания из различных научных дисциплин, таких как (рис. 1.3.):

а) молекулярная биология в комплексе с микробиологией образуют биотехнологию микроорганизмов;

б) объединение знаний из таких областей, как молекулярная биология, микробиология и химическая инженерия привели к созданию молекулярной биотехнологии;



Рисунок 1.3. Научный потенциал для развития биотехнологии и производства коммерческой продукции в животноводстве.

с) клеточная биология в комплексе с молекулярной биологией и микробиологией образуют клеточную биотехнологию;

д) клеточная биотехнология, биология размножения животных, акушерство и хирургия – эти науки привели к созданию такого направления как биотехнология воспроизводства животных;

е) биология развития животных, разведение и селекция животных, ветеринария и вышеперечисленные науки – к созданию биотехнологии животных;

ф) молекулярная и клеточная биотехнология в комплексе с биотехнологией воспроизводства формируют новое направление науки под названием эмбриоинженерия.

И такое воссоединение наук для образования новых направлений в биотехнологии можно продолжить.

Но следует помнить, что биотехнология как наука была зарождена, прежде всего, благодаря открытиям в области фундаментальных наук, а именно – в области молекулярной и клеточной биологии и биологии микроорганизмов. Далее, по мере любознательности и потребности, в зависимости от уровня воздействия и сферы применения, происходило “отпочковывание” уже в самой биотехнологии.

1.5. Биотехнология: зарождение, становление и развитие

Термин “биотехнология” впервые был применен в 1917 году венгерским инженером Карлом Эреки, который описал процесс крупномасштабного производства свинины (табл. 1.4.). По словам К.Эреки, биотехнология – это «все линии работ, которые производят продукты при помощи живых существ». Но официальным научным признанием для биотехнологии стал 1961 год, когда шведский микробиолог Карл Геран Хэден рекомендовал переименовать научный журнал «Микробиология, биохимическая инженерия и технология» на «Биотехнология и биоинженерия». С этого времени биотехнология неотъемлемо связана с «промышленным производством товаров и обслуживанием процессов путем использования биологических организмов, систем и процессов» (Bernard R.Glick, 1998).

Если рассматривать развитие биотехнологии по направлениям, то можно проследить такую закономерность, что до конца 60-х годов двадцатого столетия исследования проводились, в основном, в области размножения (искусственное осеменение, суперовуляция, трансплантация эмбрионов). В конце 60-х и начале 70-х гг. биотехнология свои исследования сосредотачивает в области клеточных технологий, таких как, экстракорпоральное оплодотворение, культивирование, криоконсервация гамет и клеток. А с 1973 года биотехнология проникает уже в область молекулярных разработок («конструирование» рекомбинантных ДНК) со специализированными программами микробиологии («векторная» микробиология). Такое развитие свидетель-

ствуется о том, что чем глубже наши знания в области живой материи, тем шире влияние биотехнологии на нашу жизнь.

Стратегии и экспериментальные основы биотехнологии подвергаются быстрым изменениям в пределах короткого времени (1978–1990 гг.). Если

Таблица 1.4. Биотехнология: историческая справка	
Дата	Событие
1890	Волтер Хип впервые трансплантирует эмбрион кролика от донора реципиенту
1917	Карл Эрки вводит термин «биотехнология»
1961	Начало создания и выпуска журнала «Биотехнология и биоинженерия»
1973	Н. Бауэр и С. Кохан создают технологию рекомбинантной ДНК
1975	Кохлер и Милстейн описывают производство моноклональных антител
1978	Компания «Genentech» производит человеческий инсулин в <i>E. coli</i>
1980	Американский Верховный суд устанавливает право на патент компании "Diamond & Chakrabarty" по генетическим манипуляциям с микроорганизмами
1981	Проданы первые коммерческие ДНК – синтезаторы
1982	Первая вакцина для животных, производимая на основе рекомбинантной ДНК, получает одобрение для использования в Европе
1988	Публикация метода полимеразной цепной реакции (PCR – polymerase chain reaction)
1990	Методика генной терапии для соматических клеток человека получает одобрение в Соединенных Штатах
1990	Официальное начало проекта «Геном человека»
1997 по настоящее время	Клонирование ядер млекопитающих

на ранних стадиях своего развития биотехнология могла только «повлиять» на один какой-либо биологический процесс (например, экстракорпоральное оплодотворение), то в настоящее время, она может изменить геном всей популяции (трансгеноз). Для будущего в биотехнологии неизбежным является применение методов, обеспечивающих развитие биосистем с новыми функциями и способностями синтеза важных коммерческих продуктов метаболизма.

Конечной целью всех исследований в области биотехнологии является развитие коммерческой продукции. Следовательно, движущим рычагом в развитии

биотехнологии является экономика. В экономически развитых странах биотехнология развивается очень быстро и прогрессивно. "Китами" в этой сфере являются Америка, страны Европы (Англия, Германия, Франция, Нидерланды) и Япония. В удельном весе 50% от всей биотехнологической продукции приходится на Соединенные Штаты, 20% – на Европу, 11% – на Японию и 9% – на экономически менее развитые страны. Так, в настоящее время в мире насчитывается примерно 3000 компаний, занимающихся клонированием генов, из которых 1500 принадлежат Америке. И это не мелкие, раздробленные компании, а целые корпорации, которые действуют как одно целое звено с целью производства генетико - проектируемых антител в борьбе с инфекционными болезнями, раком и другими "погрешностями" человека. В Японии биотехнология является "национальным приоритетом" и действует как "стратегическая промышленность". Европейская биотехнологическая промышленность также имеет устойчивое развитие.

Для всех действующих биотехнологических компаний и корпораций важным условием является то, что биотехнология вносит беспрецедентную выгоду человечеству. Это должно:

- обеспечивать возможности точно диагностировать, предотвращать и вылечивать широкий диапазон инфекционных и генетических болезней;
- развивать микроорганизмы, которые произведут антибиотики, полимеры, аминокислоты, ферменты и другие продовольственные добавки;
- значительно увеличить урожай путем создания сортов растений, стойких к паразитам и вирусным заболеваниям;
- развивать племенное животноводство путем создания скороспелых животных с повышенной резистентностью;
- облегчать удаление загрязнителей окружающей среды.

Положительные аспекты биотехнологии не исключают возникновение вопросов, которые на сегодняшний день остаются открытыми:

1. Какой вред следует ожидать от генно-инженерных конструкций?
2. Повлияют ли генетически проектируемые организмы на естественное биологическое разнообразие?
3. Подорвет ли сельскохозяйственная биотехнология традиционные методы селекции?
4. Как долго биотехнология будет приоритетом богатых стран и др.?

Биотехнология животных в Казахстане. Развитие биотехнологии в животноводстве в нашем государстве, к сожалению, происходит медленными темпами. Если до 1991 года методы биотехнологии были распространены в скотоводстве (Безруков Н.И., Мамлеев Р.С. и др.) и овцеводстве (Мухамедгалиев Ф.М., Жанабеков К.Ж., Мурзамадиев А.М., Касымов К.Т., Тойшибеков М.М. и др.) республики, то после экономических катаклизмов, через которые пришлось пройти нашему государству в период перестроичных реформ (с 1991 года по настоящее время), они "не потеряли своего равновесия" лишь в овцеводстве.

Если же рассматривать развитие отечественной биотехнологии животных в лицах, то "крестными отцами" для нас являются такие ученые как Мухамедгалиев Ф.М., Жанабеков К.Ж., Абильдинов Р.Б., которые впервые ис-

пользовали методы суперовуляции и трансплантации эмбрионов и благодаря которым была основана отечественная биотехнология животных.

В настоящее время в Казахстане сформирована группа специалистов, которые могут проводить работы по биотехнологии животных, это такие ученые, как Касымов К.Т., Тойшибеков М.М., Садыкулов Т.С., Аузбаев С.А., Малмаков Н.И.; Салыкбаев Т.Н., Джамалова Г.А., Буралхиев Б.А. и др.

При этом следует отметить, что если институт ЭБ АН РК делает попытки с 2002 года заниматься клеточными технологиями, то остальные лаборатории проводят исследования по биотехнологии воспроизводства. Кроме того, необходимо обратить внимание на тот факт, что лаборатория "Биотехнология животных" при КазНАУ (руководитель, Садыкулов Т.С.) совмещает учебный процесс с научно-производственным, обеспечивая, тем самым, интеграцию между образованием, наукой и производством.

В настоящее время, под руководством профессоров Садыкулова Т.С. и Касымова К.Т. методы биотехнологии животных наиболее эффективно внедряются в практику разведения дегересских овец (глава 9.5.). В этой связи, начиная с 1997 года проводятся научные исследования в частном племенном хозяйстве "Мади" Алматинской области (предприниматель Касенов Т.).

Резюме

Из всего вышеизложенного можно сделать следующие выводы: 1) биотехнология как наука вносит беспрецедентную выгоду человечеству и 2) движущим рычагом в развитии биотехнологии является экономика.

И не удивительно, что традиционные методы селекции в животноводстве не могут обойтись без биотехнологических приемов и методов. При изучении методов биотехнологии Вы обратили внимание на то, что в животноводстве основными направлениями являются (рис. 1.4.):

1) эмбриотрансплантация – исследования основаны на применении методов биотехнологии воспроизводства;

2) эмбриокультура – исследования основаны на применении методов клеточной биотехнологии и биотехнологии воспроизводства;

3) эмбриоинженерия – исследования основаны на применении методов молекулярной и клеточной биотехнологии и биотехнологии воспроизводства.

Такое разделение, прежде всего, обусловлено тем, что эти методы настолько тесно взаимосвязаны между собой, что не могут существовать в изоляции друг от друга. Так, при трансплантации (вымывание и пересадка) полученный эмбрион обязательно подвергается эмбриокультуральным исследованиям (оценка, селекция и культивирование), а при современных требованиях, с целью получения конкурентоспособной животноводческой продукции, эмбрион дополнительно подвергается клеточным технологиям (транسخеноз, клонирование).

БИОТЕХНОЛОГИЯ ЖИВОТНЫХ



ЭМБРИОИНЖЕНЕРИЯ

ЭМБРИОКУЛЬТУРА

ЭМБРИОТРАНСПЛАНТАЦИЯ

Рисунок 1.4. Методы биотехнологии в животноводстве

Методы эмбриотрансплантации, эмбриокультуры и эмбриоинженерии взаимно дополняют друг друга, обеспечивая "конвейерную" систему исследований в области биотехнологии животных. Поэтому благодаря биотехнологии животный организм уже сегодня может продуцировать ценные генетико-проектируемые продукты метаболизма.

Ключевые слова и понятия:

Биологический банк гамет	Племенные животные
Биотехнология	Пользовательное стадо
Биотехнология воспроизводства	Предимплантационное развитие эмбриона
Биотехнология животных	Пробник
Биотехнология клеточная	Производитель
Биотехнология молекулярная	Репродукция
Биотехнология сельскохозяйственная	Реципиент
Глобальная задача биотехнологии	Селекционное ядро
Донор	Эмбрион
Методологическая задача биотехнологии	Эмбриоинженерия
Методы биотехнологии	Эмбриокультура
Объект исследования в биотехнологии	Эмбриотрансплантация

Контрольные вопросы:

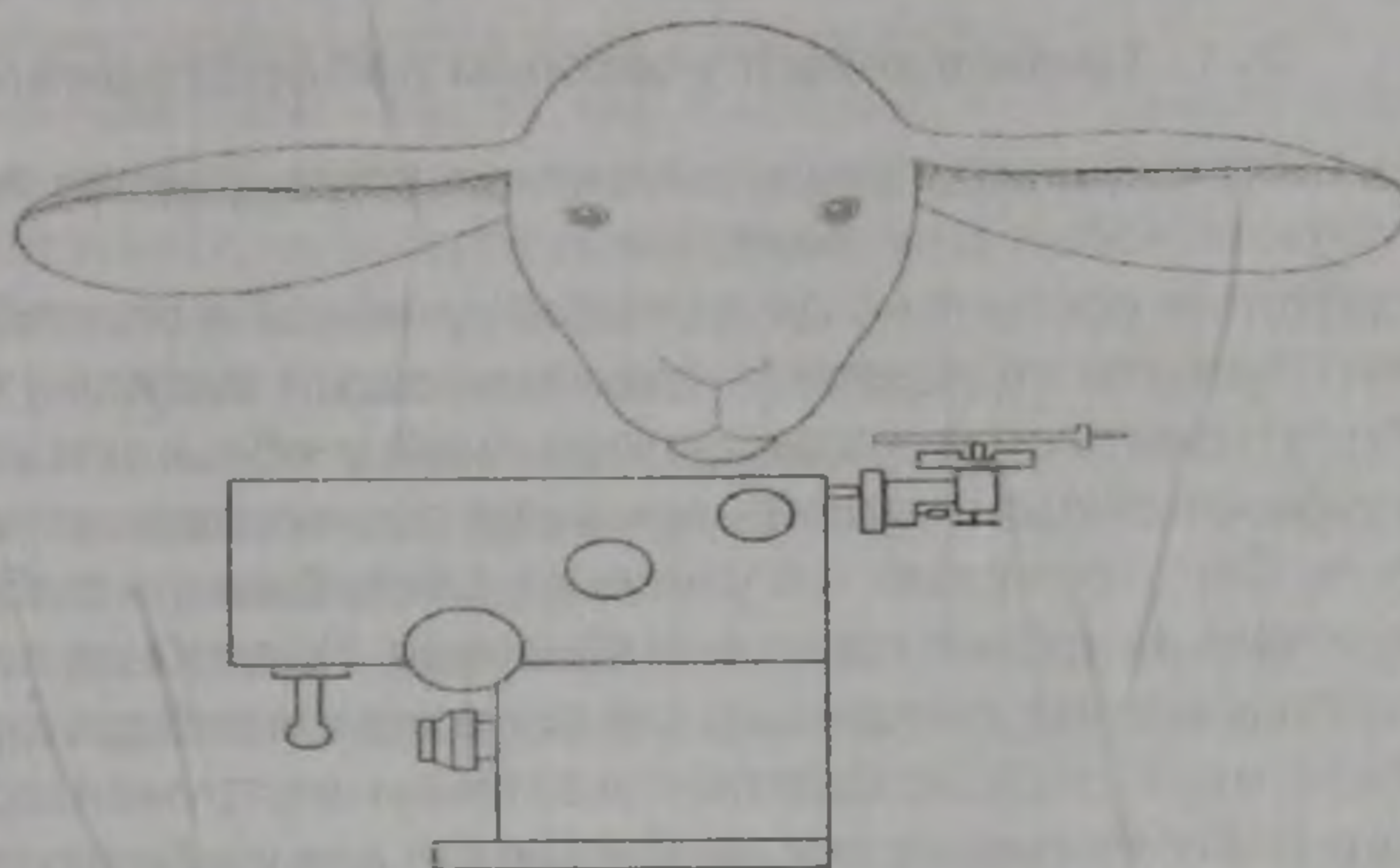
1. Что собой представляет наука биотехнология?
2. Что служит объектом исследования для биотехнологии?
3. Каковы различия между такими понятиями, как метод биотехнологии и направление биотехнологии?
4. Какое отношение К.Эреки имеет к биотехнологии?
5. Каким образом развивалась наука «биотехнология»?
6. Какое открытие послужило основой для зарождения и формирования молекулярной биотехнологии?
7. Какое открытие послужило основой для зарождения и формирования клеточной биотехнологии?
8. Методы биотехнологии в зависимости от сферы применения.
9. Сельскохозяйственная биотехнология: методы и задачи.
10. Методы биотехнологии в зависимости от уровня воздействия на биологическую систему.
11. Какое открытие послужило основой для зарождения и формирования биотехнологии воспроизводства животных?
12. Какова цель и задачи биотехнологии, в частности, биотехнологии животных?
13. Глобальная и методологическая задача биотехнологии в животноводстве.
14. Биотехнология животных: цель, задачи и методы.

15. Какие методы использует биотехнология воспроизводства для выполнения своих задач?
16. Какие методы использует клеточная биотехнология животных для выполнения своих задач?
17. Какие методы использует молекулярная биотехнология животных для реализации своих возможностей?
18. Почему биотехнология тесно соприкасается с другими науками?
19. Можно ли рассматривать биотехнологию в изоляции от других наук?
20. Почему биотехнология использует различные биологические системы?
21. Почему для биотехнологии движущим рычагом служит экономика?
22. В каких странах биотехнология более развита, а в каких – менее и почему?
23. Может ли биотехнология повлиять на естественное биоразнообразие?
24. Может ли сельскохозяйственная биотехнология подорвать традиционные методы селекции?
25. Как развивается биотехнология в Казахстане?
26. Ученые Казахстана, занимающиеся биотехнологией.
27. Почему традиционные методы селекции в животноводстве не могут обойтись без биотехнологических приемов и методов?
28. Какие государства являются «китами» в биотехнологии?
29. В каких странах наблюдается тенденция устойчивого развития биотехнологии?
30. Какую выгоду человечество получает от биотехнологии?

Рекомендуемая литература. При изучении вопросов, касающихся методов биотехнологии рекомендую обратиться к работам: Anonymous. 1987. *New Developments in Biotechnology—Background Paper: Public Perceptions of Biotechnology*. Office of Technology Assessment, U.S. Congress, U.S. Government Printing Office, Washington, D.C; Bud, R. 1991. *Biotechnology in the twentieth century*. *Soc. Stud. Sci.* 21:415-457; Busch, L., W. B. Lacy, J. Burkhardt, and L. R. Lacy. 1992. *Plants, Power, and Profit: Social, Economic and Ethical Consequences of the New Biotechnologies*. Blackwell Publishers, Cambridge, Mass.

История развития биотехнологии очень подробно описаны в работах Bud, R. 1993. *The Uses of Life: a History of Biotechnology*. Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom; Davis, B. D. (ed.). 1991. *The Genetic Revolution: Scientific Prospects and Public Perceptions*. The Johns Hopkins University Press, Baltimore, Md.

ЧАСТЬ I. ОСНОВЫ ЛАБОРАТОРНОГО ДЕЛА В БИОТЕХНОЛОГИИ



В зависимости от цели назначения различают два типа лабораторий: 1) *научные*, предназначенные для научно-исследовательской деятельности; 2) *учебные*, предназначенные для студентов с целью изучения и освоения основных методов и приемов, используемых в биотехнологических исследованиях на животных. Лаборатории первого типа располагаются как в учебных заведениях, так и научно-исследовательских институтах, а второго – только в учебных заведениях. Особенности организации работы в научных лабораториях определяется тем, что, во-первых, исследования проводят только профессионально подготовленные специалисты; во-вторых, посторонние лица в такие лаборатории не допускаются и, в-третьих, исследования проводятся на сельскохозяйственных животных (при апробации методик на лабораторных животных).

Последнее относится к лабораториям по биотехнологии сельскохозяйственных животных. Особенностью же организации работы в учебных лабораториях является то, что все исследования проводятся только с целью изучения и освоения студентами основных методов, применяемых в биотехнологии. При этом все методы осваиваются ими на лабораторных животных.

Глава 2. Организация работы лаборатории по биотехнологии в животноводстве

Цель: Ознакомиться с организацией работы лаборатории по биотехнологии в животноводстве.

После изучения главы студент сможет:

- ориентироваться в лаборатории по биотехнологии животных;
- целесообразно устроить лабораторию, обеспечивая удобное размещение рабочих мест и оборудования;
- в процессе работы экономно использовать материалы;
- соблюдать все меры предосторожности при работе с оборудованием и приборами;

- рационально строить свою работу в лабораторных условиях;
- правильно организовывать все виды работ в лаборатории, вести их точно и аккуратно.

2.1. Требования к учебным лабораториям

Основные требования, предъявляемые к помещениям учебной лаборатории по биотехнологии животных:

1. Лаборатория состоит из двух секций: учебной и подсобной. В учебной лаборатории студенты овладевают навыками своей будущей специальности. Учебная лаборатория состоит из двух помещений: учебная секция и универсальный блок. В учебной секции студенты проводят познавательную - исследовательскую работу по биотехнологии, а в универсальном блоке - эмбриокультуральные исследования на уровне гамет и эмбрионов. Подсобная секция также состоит из двух помещений: питомника, где содержатся лабораторные животные и лаборантской, в которой располагаются аптека и инструментарий. В этой комнате лаборант подготавливает все необходимое для учебного процесса.

2. Учебная секция должна быть просторной и светлой. Для обеспечения достаточного освещения днем окна должны быть большими. Для вечернего освещения, помимо потолочных ламп, над каждым рабочим местом должен находиться источник света. При этом свет должен освещать рабочий стол спереди.

3. Средняя норма площади на каждого работающего должна быть около 10-14 м². Общее число студентов, входящих в состав академической группы, не должно превышать 8-10. При большем числе студентов преподаватель не сможет уделить должного внимания каждому присутствующему, что приведет к снижению качества обучения.

4. В лаборатории необходимы водопровод, проводка технического тока и водонагревательные приборы.

2.2. Организация работы лаборатории

Организация работы в учебной лаборатории сложна тем, что за короткий промежуток времени (2 - 4 академических часа) преподавателю необходимо, во-первых, дать полное разъяснение по изучаемому вопросу; во-вторых, показать методику проведения эксперимента и, в-третьих, обучить студента данной методике. При этом каждое занятие предполагает при работе с лабораторными животными применение основной процедуры по биотехнологии воспроизводства - метода лапаротомии. Благодаря этому студенты в совершенстве овладевают методами трансплантации эмбрионов. Поэтому преподаватель должен стремиться рационализировать работу таким образом, чтобы при минимальной затрате средств и времени получить максимальный эффект. Для достижения этого важнейшими условиями являются:

- 1) целесообразное устройство лаборатории, что обеспечивается удобным размещением рабочих мест и оборудования;
- 2) подбор соответствующих инструментов, лабораторной посуды, необходимых аппаратов и приборов;
- 3) хорошая подготовка к работе;

4) экономное использование материалов при постановке учебных экспериментов.

Организация работы в учебной лаборатории. В учебной лаборатории необходимо организовать следующие отделы работ:

1. Операционный блок – место, где проводится операция. Из расчета на число студентов необходимо наличие 4 - 5 операционных блоков. При этом каждый блок включает следующее оснащение:

а) операционный лабораторный стол, которых не должно быть меньше двух и размеры которых зависят от вида лабораторного животного;

б) подставка для стерильного инструментария, на котором в определенном порядке расположены инструменты, шовный материал для данной операции и биксы со стерильным бельем;

в) подставка для размещения специальных склянок, шприцов, катетеров, необходимых для осуществления различных манипуляций с эмбрионами;

г) стойка-подставка для эмалированного таза, куда складываются использованный перевязочный материал и инструменты.

Над всеми четырьмя или пятью операционными блоками устанавливается бактерицидная лампа. В комплексе, все четыре операционных блока составляют учебную секцию. Необходимо уяснить, что студенты работают с лабораторными животными, которые отличаются малыми размерами, поэтому каждый операционный блок помещается на двух лабораторных столах. Всего же таких столов – 8 - 10. Каждый операционный блок обслуживается двумя студентами.

2. Универсальный блок – это отдельная комната, которая смежно располагается с учебной аудиторией (рис. 2. 1.). В этой комнате сосредоточены все оборудования и приборы, необходимые для проведения студентами эмбриокультуральных исследований.

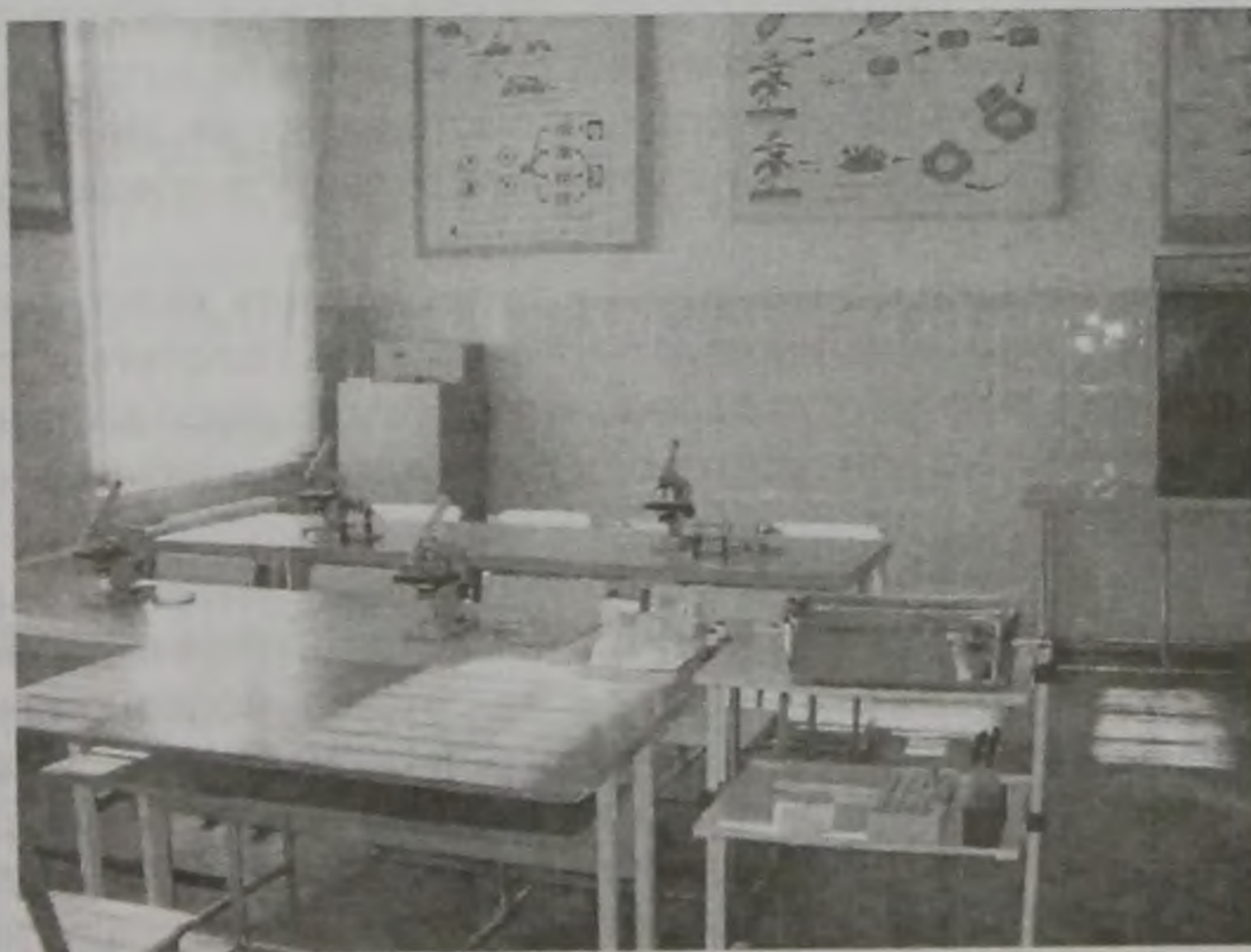


Рисунок 2.1. Лаборатория «Биотехнология животных» при кафедре селекции и биотехнологии КазНАУ

Организация работы в подсобных помещениях. Как было отмечено выше, подсобная секция состоит из питомника и лаборантской комнаты. В лаборантской комнате организуются следующие отделы работ:

1. Материальный и инструментальный блок. Этот блок предназначен для хранения белья, материалов, инструментов и посуды. перевязочный материал и биксы со стерильным бельем должны храниться в запирающихся шкафах. Инструменты хранятся в специальных стеклянных шкафах. Перед учебным процессом здесь составляют наборы инструментов, производят подготовку шовного материала, операционного перевязочного материала (салфетки, тампоны, шарики, маски).

Чистота и требования асептики должны соблюдаться строго. Хранение грязного белья здесь недопустимо.

2. Стерилизационный блок – место, предназначенное для стерилизации инструментария, которое производится иногда непрерывно в течение всего учебного процесса.

3. Аптека предназначена для хранения медикаментов. Аптека представляет собой шкаф с ящиками и откидным столом. На нем производят отбор лекарственных и гормональных средств, приготовление растворов и наборы их в шприцы или мерные мензурки.

Лаборантская комната должна быть оборудована водопроводными кранами со специальными раковинами для мытья посуды и инструментов.

В лаборатории по биотехнологии лабораторные животные содержатся в специально предназначенных для них помещениях, называемых питомником. В питомник животные поступают из вивария за 24 часа до учебного эксперимента. Здесь животные в зависимости от вида и пола размещаются в специально предназначенные для них клетки. Целью размещения животных в питомнике является выдержка их на голодной диете. Поэтому животные в питомниках имеют только доступ к воде (через автопоилки). Питомник обслуживается штатным лаборантом.

Техника безопасности. Соблюдение мер техники безопасности необходимо при всех работах в лаборатории по биотехнологии. Не нужно пренебрегать теми мерами охраны труда, которые являются обязательными для данного рода работы.

Каждый работающий в лаборатории должен иметь халат, фартук из полиэтилена, медицинские резиновые перчатки и два полотенца: одно, предназначенное для постоянного пользования и находящееся всегда под рукой, другое – исключительно для работ по биотехнологии, связанных с эмбрионально-культуральными исследованиями.

В лабораториях бывают случаи, требующие неотложной медицинской помощи – порезы рук, ожоги или укус животного. Для оказания первой помощи в лаборатории должна быть аптечка. В лаборатории полезно иметь специальные плакаты о мерах оказания помощи при несчастном случае.

Из всего вышеизложенного следует, что при работе в лаборатории по биотехнологии животных нужно соблюдать следующие *правила работы*:

1. Рационально строить свою работу. При постановке опыта необходимо сконцентрировать свое внимание на работе, только в этом случае проводимые вами процедуры будут методически правильно поставлены и организованы.

2. Соблюдать все меры предосторожности при работе с животными, оборудованием, приборами, инструментами и медикаментами. Помните, что ставя эксперимент на животных, Вы постоянно используете те или иные атрибуты, которыми нужно манипулировать. Поэтому Вы должны очень осторожно и правильно применять их, чтобы не поранить себя и животных.

3. Все работы вести точно и аккуратно. Каждый используемый Вами метод предполагает проведение серийных процедур, которые между собой очень тесно связаны. Неточность, которую Вы можете случайно допустить в какой либо процедуре эксперимента, плачевно отразится, прежде всего, на здоровье подопытного животного. Поэтому, на лабораторном занятии студент должен вооружиться теми знаниями, которые ему понадобятся для постановки эксперимента по определенной теме.

4. Работать следует быстро, но без спешки. Время, предоставленное студенту для постановки опыта по изучению темы, всегда ограничено. Поэтому необходимым условием для работы в лаборатории является теоретическая подготовленность студента к изучению темы путем освоения определенной методики.

2.3. ОБОРУДОВАНИЕ ЛАБОРАТОРИИ

Оборудования и приборы, имеющиеся в лаборатории по биотехнологии животных, в зависимости от цели назначения, делят на два класса: общие и специальные. Первые имеются во всех лабораториях, вторые – строго специализированы.

К приборам общего назначения относят:

1. Дистиллятор – прибор, позволяющий получать дистиллированную воду. Это вода почти не содержит неорганических и органических веществ. Ее получают путем перегонки водопроводной воды, т.к. воду превращают в пар и конденсируют. Такую воду применяют для приготовления растворов, споласкивания посуды после мытья и т.д.

2. Термостат – прибор, позволяющий поддерживать температуру на одном уровне. Термостаты бывают жидкостные и воздушные. Для первых теплоносителем служит вода, для вторых – воздух. Для биотехнологических работ применяют воздушные термостаты с электрическим обогревом, снабженные терморегулятором и термометром.

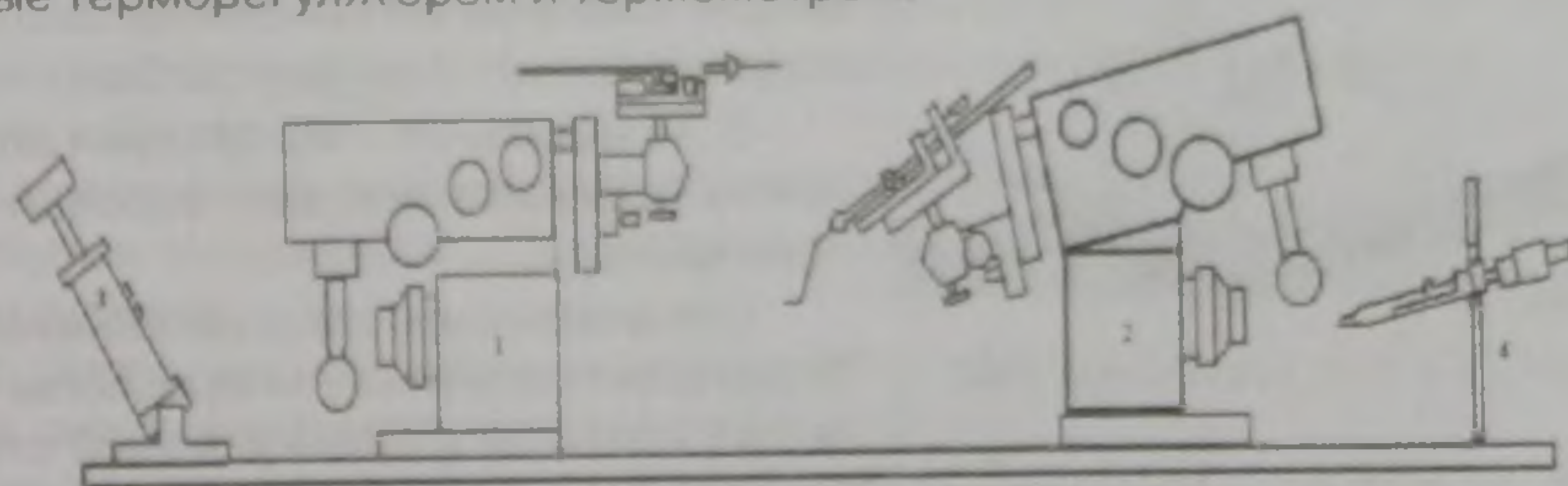


Рисунок 2.2. Упрощенная схема основных деталей микроманипуляционной установки, используемой для клеточных технологий: 1, 2 – микроманипуляторы, закрепленные на платформе; 3 – Насос де Фонбрюна, сообщающий системе положительное или отрицательное давление; 4 – Шприц Агла с микрометром

3. Электрический сушильный шкаф – прибор, позволяющий сушить посуду горячим воздухом. Питание нагревательных элементов производится от электросети. Максимальная температура, которая может быть достигнута внутри шкафа, составляет около 125 - 250°С. Время разогревания – 30 - 60 мин.

4. Автоклав – прибор, в котором производится стерилизация паром под давлением. Автоклав – это металлический котел с двойными стенками. Пространство между наружной и внутренней стенкой под крышкой автоклава сообщается с пространством внутри котла. Через воронку водомерного стекла между стенками автоклава заливается вода до уровня, указываемого на водомерном стекле. Внутри автоклава укладывают биксы, наполненные стерилизуемыми предметами, крышку автоклава плотно закрывают и привинчивают винтами. При кипении вода испаряется, пар заполняет все пространство в автоклаве. Так как выхода для пара нет, в автоклаве начинает повышаться давление и температура. Они быстро достигают уровень, при котором жизнь микробов невозможна. Давление и температура внутри автоклава определяются по манометру, установленному на боковой стенке автоклава.

5. Баня водяная электрическая – прибор, используемый для нагрева. Водяные бани применяют только в тех случаях, когда требуется нагревание не выше 100°С. Бани закрываются сверху рядом concentрических, налегающих одно на другое колец.

Нагревание на водяной бане можно проводить двумя способами: обогреваемую посуду погружают в кипящую воду, в этом случае температура нагрева достигает 100°С; обогреваемая посуда не касается воды и нагревается только водяным паром, температура нагрева на несколько градусов ниже 100°С.

В баню наливают воду так, чтобы до краев оставалось 2-3 см. Нагреваемый сосуд помещают на кольцо такого диаметра, чтобы своей нижней частью он находился на 1,5 - 2 см внутри бани.

6. Холодильник – используют для хранения медикаментов, растворов, и питательных сред.

Специальными оборудованностями лаборатории являются: микроскопы – инвертированный и бинокулярный стереоскопический (серии МБС); термостат – инкубатор; замораживающее устройство и сосуд Дьюара; микроманипулятор с микроузницей и многое другое;

7. Ламинарный бокс – это приспособление, благодаря которому обеспечивается полная изоляция и стерильность при работе с гаметами и эмбрионами. Конструкция ламинарного бокса основана на том, что поверхность



Рисунок 2.3. Микроскоп серии МБС.

стола изолирована стеклянным «колпаком», а внутри сосредоточены необходимые приборы. Обязательным внутренним атрибутом данного стола является инвертированный микроскоп и микроманипулятор, с помощью которых производят различные микроклеточные манипуляции с эмбрионами или гаметами животных (рис. 2.2.).

В эмбриокультуральных исследованиях применяют также ламинарные боксы, предназначенные для приготовления питательных сред. При этом ламинарный бокс первого типа не должен находиться в одном помещении с ламинарным боксом второго типа.

8. Микрокузница – это прибор, предназначенный для изготовления микроинструментов. Микроинструменты изготавливаются из стеклянных крючков, игл и капилляров с применением спиртовой горелки (спиртовки).

9. Термостат – инкубатор – прибор, предназначенный для культивирования гамет и эмбрионов и предоставления гаметам условий для успешного оплодотворения. Данный инкубатор рассчитан на $37^{\circ}\text{C} - 37,5^{\circ}\text{C} (\pm 2^{\circ}\text{C})$ и содержит 5% CO_2 в воздухе. Система контроля концентрации CO_2 обычно входит в конструкцию инкубатора.

Благодаря такому термостату в условиях *in vitro* эмбрионы и гаметы получают все необходимое для полноценного развития в «культуре».

10. Микроскоп серии МБС (рис.2.3) – прибор, предназначенный для эмбриокультуральных исследований (оценка, селекция и отбор эмбрионов).

11. Микроманипуляционная система – оборудование, предназначенное для клеточных технологий.

Об остальных оборудованиях подробнее будет изложено в других главах этого учебника.

2.4. Лабораторный инвентарь

В лаборатории по биотехнологии животных к лабораторному инвентарю можно отнести стеклянную посуду, гинекологические инструменты, хирургические инструменты и хирургическое белье. Современный лабораторный инвентарь (посуда, инструменты, белье) очень разнообразен. В этой главе рассматривается только тот инвентарь, который наиболее часто применяется в учебном процессе при постановке биотехнологических исследований на животных.

1. *Лабораторная стеклянная посуда.* Применяемую в лаборатории стеклянную посуду, в зависимости от назначения, делят на: 1) общую, 2) специальную и 3) мерную.

К группе общего назначения относятся те предметы, которые всегда должны быть в лаборатории и без которых нельзя провести большинство работ. К ним относят:

1. Пробирки – это узкие цилиндрической формы сосуды с закругленным дном; они бывают различной величины и диаметра. Их используют в различных манипуляциях при эмбриокультуральных исследованиях. Хранятся в штативах.

2. Чашки Петри – это круглые плоскодонные чашки, используемые для сбора эмбрионов, фолликулов и сперматозоидов. Это необходимый атрибут при культивировании и экстракорпоральном оплодотворении.

3. Лабораторные стаканы и конические колбы – тонкостенные цилиндры различной емкости, широко применяются в работах, связанных с приготовлением сред.

4. Предметные и покровные стекла – плоские прямоугольной формы стеклянные предметы, необходимые для проведения работ по клеточной селекции.

К группе специального назначения относятся те предметы, которые употребляются для одной какой-либо цели. К ним относят:

5. Спермиоприемник – это стеклянный двустенный колоколообразный с цилиндрической пробиркой на конце сосуд, используемый для получения спермы.

6. Стеклянные крючки, иглы, капилляры, которые имеют микроскопические размеры и изготавливаются на специальных приспособлениях – «микрокузницах». Широко применяются в различных микрохирургических манипуляциях для оказания механического воздействия на клетки.

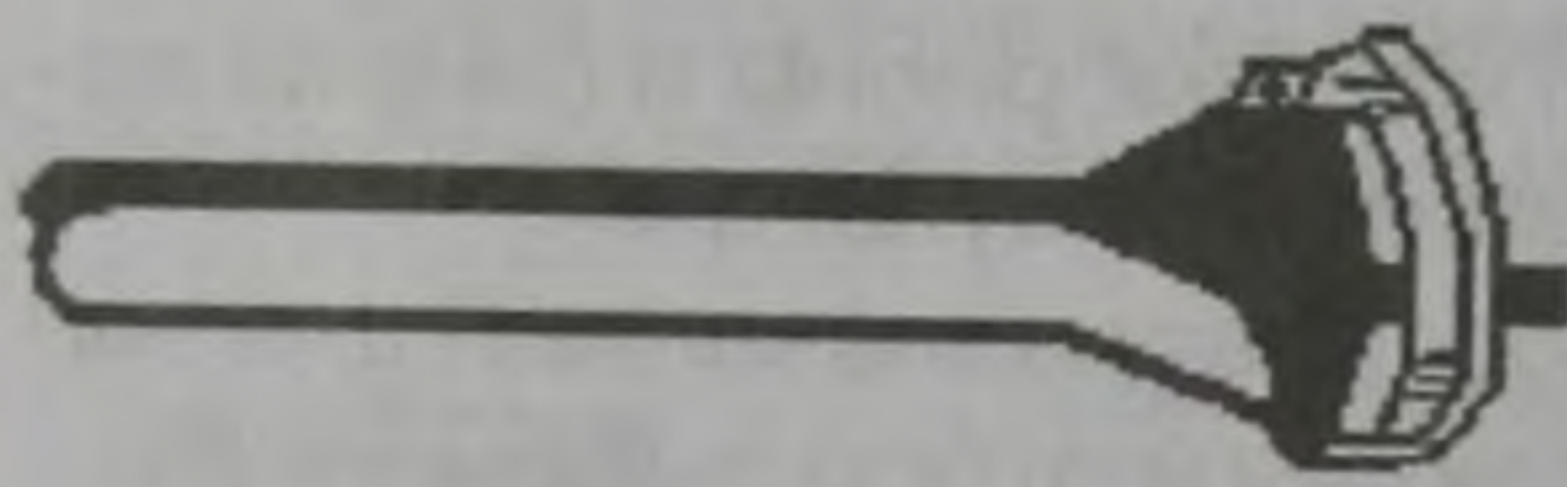


Рисунок 2.4. Влагалищное зеркало.

7. Стеклянные пипетки, необходимые для переноса эмбрионов при эмбриональных исследованиях.

Мерная посуда, необходимая для измерения объема жидкости. К ним относят:

8. Мерные цилиндры и мензурки – это стеклянные сосуды цилиндрической или конической формы, на стенке которых

имеется шкала деления. Они необходимы при работах, связанных с эмбриональными исследованиями, искусственном осеменении и трансплантации эмбрионов.

9. Пипетки и микропипетки – используют для отмеривания малых объемов жидкостей, емкостью 1, 2, 3, 4 и 5 мл.

2. Гинекологический инструментарий необходим при работах, связанных с биотехнологией воспроизводства сельскохозяйственных животных. К наиболее часто используемым относят:

1) влагалищное зеркало, предназначенное для исследования влагалища и влагалищной части шейки матки (рис.2.4.);

2) катетеры различных конструкций, используемые при искусственном осеменении и трансплантации эмбрионов.

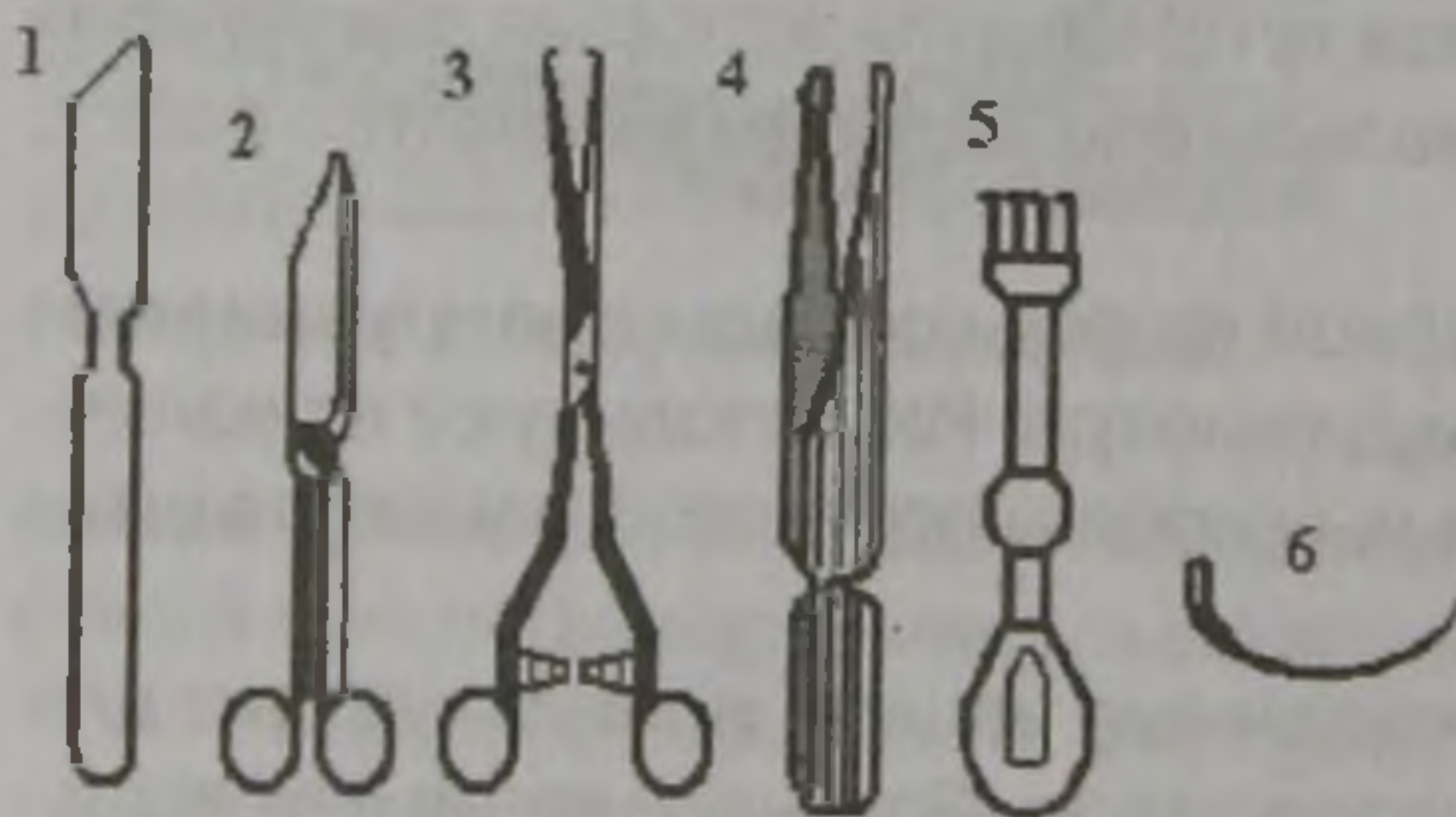


Рисунок 2.5. Хирургический инструментарий.

1 – брюшистый скальпель; 2 – ножницы; 3 – зажим Кохера; 4 – пинцет анатомический; 5 – крючок четырехзубчатый тупой; 6 – хирургическая игла.

3. Хирургический инструментарий (рис. 2.5.).

К наиболее часто употребляемым инструментам при трансплантации эмбрионов хирургическим способом относятся:

1) брюшистый скальпель, который предназначен для поверхностного неглубокого разреза;

2) ножницы прямые остроконечные и ножницы Купера – применяют для разъединения тканей;

3) зажим Кохера, зажим «маскит» – это кровоостанавливающие зажимы;

4) пинцет хирургический и анатомический применяют для захватывания тканей, удержания их в удобном для сшивания или разделения положении;

5) бельевая цапка, необходимая для фиксации простыни (или салфетки) с отверстием на операционном поле тела животного;

6) крючок четырехзубчатый острый и тупой, ранорасширитель Микулича – с их помощью осуществляют расширение ран и удержание их в нужном состоянии;

7) изогнутая или полукруглая хирургическая игла необходима для закрытия операционных ран кожи с целью восстановления их целостности и создания условий для благоприятного течения процесса заживления; благодаря иглу шовный материал (кетгут) проводят через ткани;

8) шприцы вместимостью 5, 10 мл применяют для введения жидких форм лекарственных веществ или биологических препаратов в толщу тканей или полости организма;

9) шприцы объемом 20 мл применяют для промывания гениталий с целью вымывания эмбрионов;

10) иглы инъекционные различной длины и диаметра к шприцам.

4. Хирургическое белье. При использовании хирургического метода трансплантации эмбрионов необходимо также наличие хирургического белья, это:

1) простыни размером 50x50 с отверстием по середине, предназначенные для покрытия операционного поля (размер простынь зависит от размера животных);

2) тампоны (используют при хирургических манипуляциях);

3) полотенца, халат, колпак;

4) резиновые хирургические перчатки.

Резюме

Как Вы убедились, изучение данной главы необходимо, прежде всего, для правильной организации работы в лабораторных условиях. При работе в лаборатории не нужно пренебрегать главным и нужным для успеха требованием – соблюдению порядка, чистоты и стерильности.

Выполняя ту или иную процедуру по биотехнологии в животноводстве, Вы постоянно будете сталкиваться с основными и необходимыми этапами работ, такими как вымывание и пересадка, клеточная селекция и культивирование. А все эти работы предполагают использование тех приборов и ма-

териалов, которые представлены в этой главе. Вот почему изучение изложенной темы важно с профессиональной точки зрения.

Ключевые слова и понятия:

Автоклав	Мерный цилиндр	Средняя норма площади
Баня водяная	Микрокувшинка	Стекло предметное
Бельевая цапка	Микропипетка	Стерилизатор
Бинт	Ножницы Купера	Стерилизационный блок
Брюшистый скальпель	Операционный блок	Сушильный шкаф
Дистиллятор	Охрана труда	Тампоны
Зажим «маски»	Пинцет	Термостат инкубатор
Зажим Кохера	анатомический	Техника безопасности
Иглы инъекционные	Пинцет	Техническая характеристика
Инструментальный блок	хирургический	Универсальный блок
Коническая колба	Пипетка	Хирургическое белье
Крючок	Полотенца	Хирургическая игла
четырёхзубчатый острый и тупой	Правила работы	Чашка Петри
Лаборатория учебная	Пробирка	Шприцы типа Жанэ
Материальный блок	Перчатки	
	хирургические	
	Спермиоприемник	

Контрольные вопросы:

1. Какие типы лабораторий имеются по биотехнологии в животноводстве?
2. По каким параметрам лаборатории разделяют на учебные и научные?
3. Какие требования предъявляются к учебным лабораториям? Принцип работы учебной лаборатории.
4. Как организована работа в учебной лаборатории?
5. Правила техники безопасности.
6. Какие оборудования имеются в лаборатории по биотехнологии животных в зависимости от цели назначения?
7. Оборудования общего назначения: принцип и техника работы.
8. Оборудования специального назначения: цель применения, принцип и техника работы.
9. Лабораторная посуда: общие, специальные и мерные.
10. Перечислите основные инструменты, которые применяются по биотехнологии воспроизводства животных.
11. Каким образом классифицируется лабораторный инвентарь?

Рекомендуемая литература. При изучении вопросов, касающихся организации работ в лаборатории по биотехнологии заинтересованным читателям и студентам советую обратиться к научным журналам по молекулярной биологии, физиологии животных и, конечно же, к биотехнологии.

При изучении оборудования и приборов, используемых в лабораториях по биотехнологии животных, предлагаю обратиться к работам M.H.L. Snow, 1987 (Methods in Mammalian Reproduction, Academic Press, New York) и De Fonbrune, 1949 (Technique de Micromanipulation, Masson et Cie., Paris).

При знакомстве с лабораторным инвентарем (лабораторная стеклянная посуда, хирургический инструментарий, гинекологический инструментарий) Вам поможет специальная литература по лабораторному делу, гинекологии и хирургии.

Глава 3. Правила работы с лабораторным инвентарем

Цель: Ознакомиться с правилами работы при использовании лабораторного инвентаря.

После изучения главы студент сможет:

- соблюдать все меры предосторожности при работе с лабораторной посудой, инструментами и медикаментами;
- правильно подобрать соответствующие инструменты, лабораторную посуду и необходимые аппараты при постановке опыта;
- в процессе работы экономно использовать материалы;
- соблюдать правила при работе с любым лабораторным инвентарем;
- правильно мыть, стерилизовать и хранить лабораторный инвентарь.

3.1. Правила хранения лабораторного инвентаря

Содержание лабораторного инвентаря в благоприятных условиях, тщательный уход за ними обеспечивают безотказность в работе и длительную их службу.

От правильного ухода и хранения зависит долговечность лабораторного инвентаря. Поэтому необходимо соблюдать следующие правила при работе с лабораторным инвентарем:

1) бывший в употреблении инвентарь должен быть немедленно вымыт теплой водой с мылом, причем очень тщательно щеткой промываются неровные поверхности и места соединений частей инструмента;

2) вымытые инструменты и посуда тщательно высушиваются в сушильном шкафу, замки на инструментах смазываются вазелином и затем инструменты раскладываются или развешиваются в инструментальных шкафах, а посуда – в лабораторных шкафах;

3) нельзя допускать появления ржавчины на инструментах, которая очень быстро появляется при хранении во влажных условиях или недостаточном удалении влаги из замков;

4) все режущие инструменты должны быть острыми;

5) инъекционные иглы после промывания хранят со вставленными в них мандренами в закрытом сосуде, наполненном спиртом пополам с эфиром;

6) шприцы хранят в разобранном виде;

7) кетгут хранят в 4% - ном водном растворе формалина;

8) резиновые предметы помещают отдельно от металлических инструментов.

Уход за перчатками – это один из важнейших моментов асептики. После работы перчатки тщательно моют, одновременно проверяют их целостность. Для этого перчатки надувают, лучше всего закручиванием, и погружают в воду. Дефект в перчатке легко определяется по появляющимся воздушным пузырькам.

Из всего вышеизложенного следует, что после употребления посуды и инструментария необходимо провести следующие этапы работ: очищение, мойка, сушка и перед употреблением – стерилизация.

3.2. Мытье лабораторного инвентаря

Умение мыть лабораторную стеклянную посуду, хирургический и гинекологический инструментарий является той частью лабораторной техники, знание которой обязательно для каждого работника лаборатории.

Лабораторная посуда и инструментарий должны быть совершенно чистыми, без выполнения этого условия работать нельзя. Поэтому следует научиться мыть посуду и инструменты до полной уверенности в их чистоте. Способы мытья посуды и инструментов различны и зависят от типа загрязнения. Удалить загрязнения со стенок посуды можно различными методами: механическими, физическими, химическими, физико-химическими или комбинируя их.

Для выбора способа мытья посуды и инструментов в каждом отдельном случае необходимо следующее:

1. Знать свойства загрязняющих посуду веществ.
2. Для мытья могут быть использованы все вещества, обладающие поверхностно-активными свойствами (мыло, синтетические моющие вещества, моющие глины и пр.).
3. Если загрязняющий посуду и инструментарий осадок химически стойкий, для удаления его можно применить механическую очистку (при помощи ершей и пр.).
4. Хирургические и гинекологические инструменты тщательно моются щеткой особенно в местах, имеющих неровные поверхности и места соединения частей инструмента.
5. Нужно всегда помнить о технике безопасности и возможности несчастных случаев при мытье посуды. Каждый новый работник лаборатории должен быть ознакомлен с правилами техники безопасности.

Мытье водой. Стеклянная посуда считается чистой, если на стенках ее не образуется отдельных капель и вода оставляет равномерную тончайшую пленку.

Правила мытья стеклянной посуды:

1. Если на стенках посуды имеется налет или осадок, посуду очищают (предварительно смочив водой) щеткой или ершом и уже затем окончательно моют водой. Посуду моют в теплой воде.

2. При работе с ершом нужно следить, чтобы нижний конец его не ударялся ни о дно, ни о стенки посуды, так как этим концом можно выбить дно или проломить стенку. Чтобы предотвратить возможность разбивания посуды металлическим концом ерша, на кончик его нужно надеть кусочек резиновой трубки подходящего размера.

3. Хорошо вымытую в теплой воде посуду обязательно споласкивают дистиллированной водой для удаления солей, содержащихся в водопроводной воде.

4. В раковину нельзя выбрасывать биологические препараты (гениталии), перевязочные материалы, получаемые при работе.

Мытье паром. Посуда не всегда может быть отмыта одной водой, например, таким путем нельзя отмыть загрязнения жировыми веществами. В этих случаях лучших результатов можно достичь, если мыть посуду струей горячего водяного пара.

Мытье другими моющими средствами. Для мытья посуды можно применять и другие вещества, например, мыло или специально моющиеся синтетические вещества.

При мытье водой с моющими средствами полезно поместить в колбу кусочки чистой фильтровальной или какой-либо другой мягкой бумаги. При встряхивании колбы бумага механически удаляет со стенок приставшие к ним загрязнения.

Совершенно недопустимо применять для очистки посуды песок, так как он царапает стекло. Посуда, имеющая царапины, при нагревании ломается.

3.3. Сушка лабораторного инвентаря

Иногда вымытая посуда должна быть хорошо высушена. Различают методы холодной сушки (без нагревания) и горячей (при нагревании). Если работу проводят с водными растворами, то, как правило, сушка посуды нерациональна.

Сушка на колышках. Это самый распространенный способ сушки посуды. В лаборатории должна быть специальная доска с колышками, которую обычно помещают над раковиной для мытья посуды. Вымытую посуду надевают на эти колышки и оставляют на них до тех пор, пока она не высохнет. Нужно следить за чистотой колышков и протирать их, так как на влажных колышках легко удерживается пыль и случайные загрязнения. Чтобы избежать загрязнения посуды от колышков, их можно обертывать чистой фильтровальной бумагой и уже потом надевать на них посуду.

Сушка воздухом. Вымытую посуду можно высушить струей воздуха. Для этой цели следует применять резиновые груши. Сушить можно как холодным, так и нагретым воздухом. Через высушиваемый сосуд продувают воздух до полного удаления следов влаги.

Сушка спиртом и эфиром. Обтерев сосуд снаружи чистым полотенцем, ополаскивают его сначала чистым этиловым спиртом, а затем чистым диэтиловым (серным) эфиром. Пары эфира удаляют продуванием холодного воздуха.

Сушка в сушильном шкафу. Быстро высушить посуду можно также в сушильном шкафу. Обычно в сушильный шкаф посуду ставят после того, как она некоторое время постояла перевернутой (на колышках) для удаления воды. Сушку проводят при температуре 80 - 100°C в течение 30 - 60 мин. Перед сушкой на полку шкафа следует положить кусок чистой фильтровальной бумаги.

Посуду при высушивании в сушильном шкафу не следует ставить вверх дном, так как это замедляет улетучивание паров воды. После сушки в сушильном шкафу посуду сразу применять нельзя, ей нужно сначала дать остыть.

Таким образом, при мытье и сушке лабораторной посуды и инструментов необходимо помнить следующее:

1. Посуда всегда должна быть чисто вымыта и ополоснута дистиллированной водой.
2. При работе с ершом нужно следить, чтобы нижним его концом *не проткнуть* дно или не пробить стенку сосуда.
3. При сушке посуды надо следить, чтобы *она не загрязнилась*.
4. Выбирая способ мытья, прежде всего, нужно учитывать, каким веществом загрязнена данная посуда.
5. При мытье посуды следует придерживаться правил техники безопасности и санитарии. Мыть посуду желательно в резиновых перчатках.
6. Для отмыывания загрязнений следует применять наиболее дешевые материалы.
7. Хирургические и гинекологические инструменты после мытья обязательно нужно высушить. Недопустимо инструменты хранить во влажных условиях. Поэтому их высушивают в сушильных шкафах. Сушку инструментов проводят при температуре 100 - 120°C в течение 40 - 80 минут. До следующего применения инструменты хранят в инструментальных шкафах. А перед повторным применением – стерилизуют.

3.4. Стерилизация лабораторного инвентаря

Уничтожение микробов и их спор на хирургическом белье, инструментарии и лабораторной посуде называют *стерилизацией*. Способы стерилизации различны и зависят от вида стерилизуемого материала.

Правила стерилизации лабораторного инвентаря:

1. Все металлические инструменты, стеклянные посуды стерилизуют кипячением. Перед кипячением инструменты очищают от покрывающей их смазки, инъекционные иглы освобождают от мандренов, острые части инструментов, а также стеклянные посуды заворачивают в марлю. Шприцы стерилизуют в разобранном виде, предварительно завернув в салфетку.

В стерилизаторы наливают воду, кипятят в течение приблизительно 15 мин., затем добавляют щелочь (1% - ный натрий карбонат, 0,1% - ная гидроокись натрия), которые повышают эффект стерилизации и кипятят еще примерно 3 мин. и только после этого на съемную решетку с помощью пинцета осторожно укладывают инструменты; решетку опускают специальными крючками в воду, закрывают крышку и кипятят в течение 15 мин. с Na_2CO_3 или 10 мин. с NaOH .

После кипячения решетку с инструментами извлекают из стерилизатора и перекадывают на операционный инструментальный столик.

2. Кетгут изготавливают из подслизистого слоя кишечника мелкого рогатого скота. Кетгут обладает свойством рассасываться в тканях животного организма в сроки от 7 до 30 дней. Выпускают кетгут в стерильных ампулах или в мотках, требующих стерилизации. Наиболее простой и быстрый способ стерилизации – это способ Покотило, когда кетгут помещают на 72 часа в 4% - ный водный раствор формалина.

3. Стерилизация перевязочного материала, белья и предметов хирургического обихода. Для стерилизации операционного белья, перевязочного материала и перчаток, а также инструментария используются специальные металлические сосуды — так называемые биксы. Биксы служат для удобства заполнения автоклава, для переноса стерильного белья в операционную и хранения стерильного белья.

Бикс представляет собой металлическую никелированную коробку с плотно закрывающейся и застегивающейся крышкой. Боковая стенка двойная, причем наружная стенка смещается и имеет несколько больших прорезей, внутренняя - неподвижная и в ней имеются мелкие отверстия, занимающие площадь, равную прорезям на наружной стенке. Когда биксы не стерильны, отверстия на внутренней стенке устанавливаются против прорезей на наружной стенке (решетка открыта). После стерилизации решетка закрывается. Это достигается смещением наружной стенки.

Биксы перед заполнением стерилизуемым материалом протирают и обязательно открывают решетки. Заполняют биксы материалом не туго, так как в противном случае может не произойти стерилизации белья, находящегося внутри.

Обычно биксы заряжают однородным материалом, например в один бикс укладывают халаты, простыни и полотенца, в другой - марлевые салфетки, шарики, бинты, деревянные палочки с накрученной на них ватой, в третий - перчатки, резиновые дренажи. К ручке крышки привязывают клеенчатый ярлык с указанием вида материала, количества, даты стерилизации.

При отсутствии специальных биксов операционное белье, перевязочный материал можно стерилизовать в мешках из плотной ткани.

При температуре 120 - 134°C и давлении не выше 2 атм. через 30 - 45 минут достигается полная стерильность всех предметов. Однако нельзя во всех случаях производить стерилизацию при 2 атм. Некоторые предметы могут портиться при данной температуре. Так, перчатки и изделия из некоторых пластмасс надо стерилизовать при 1 атм. в течение 45 - 60 минут.

Автоклавирование проводят в следующем порядке. В автоклав заливают воду до метки, установленной на водомерном стекле (при избыточном количестве воды возможно забрасывание ее внутрь автоклава). В автоклав закладывают стерилизуемые предметы (биксы с открытыми решетками, мешки) и крышку автоклава прочно завинчивают. Закрывают все краны, кроме крана, сообщающегося с внутренней частью автоклава и служащего для удаления воздуха. Включают подогрев, и через некоторое время из открытого крана на-

чинает поступать пар. После того как пар станет идти сильной струей, кран закрывают. Когда на манометре стрелка поднимается до 1 атм., кран вновь открывают. Этим полностью удаляют атмосферный воздух, избыток влаги, осаждающейся на холодных предметах, находящихся внутри автоклава. С момента, когда стрелка манометра вновь установится на цифре «1», начинают считать время стерилизации. Изменением степени нагрева или удалением части пара через предохранительный клапан поддерживают необходимую температуру и давление. Через 30 — 45 минут от начала стерилизации выключают нагревательный прибор и через краны выпускают пар из автоклава. Крышку автоклава отвинчивают тогда, когда на манометре стрелка укажет «0».

Простерилизованное белье должно быть всегда сухим, в противном случае стерильность его сомнительна.

Операционное белье при стерилизации может стать мокрым, если: 1) автоклав переполнен водой, которая при кипячении забрасывается внутрь автоклава; 2) не удалить часть пара перед началом отсчета времени стерилизации; 3) оставить остывать биксы в автоклаве; 4) горячие стерильные биксы вынести на холод или сырое помещение.

4. Стерилизация перчаток. Стерилизация перчаток может быть осуществлена автоклавированием, кипячением и погружением в антисептические растворы. Перед стерилизацией в автоклаве перчатки необходимо после высушивания покрыть слоем талька как внутри, так и снаружи. Кроме того, для предупреждения склеивания каждую перчатку отдельно обертывают слоем марли. В биксах перчатки не должны соприкасаться с его стенками, для чего на дно укладывают полотенце или слой салфеток.

Стерилизация кипячением осуществляется в дистиллированной воде в течение 20 – 35 минут. Холодная обработка заключается в погружении перчаток в 2% - ный раствор хлорамина на 15 – 30 минут или в раствор сулемы 0,1% (1:1000) на 1 – 1,5 часа с последующим промыванием стерильным физиологическим раствором или дистиллированной водой, высушиванием, обработкой тальком и хранением в стерильных биксах.

Перед операцией перчатки, надетые на руки, независимо от способа стерилизации в течение 2 минут обрабатывают спиртом.

Резюме

Успех любого научного эксперимента требует от нас соблюдения чистоты и стерильности. Работая с лабораторным инвентарем необходимо обеспечить их безотказную и длительную службу, что возможно при содержании лабораторного инвентаря в благоприятных условиях. Поэтому, работая в лабораторных условиях, необходимо владеть основными правилами по уходу, содержанию и использованию лабораторного инвентаря с целью сохранения и продления срока его использования. Освоив все методы мытья, сушки и стерилизации лабораторного инвентаря, изучив техническое оснащение и организацию работы лаборатории, студент сможет, в будущем, свободно ориентироваться в различных работах, связанных с лабораторными исследованиями по биотехнологии в животноводстве.

Ключевые слова и понятия:

Методы стерилизации
Мытье, очистка и сушка посуды
Стерилизатор

Стерилизационный блок
Стерилизация
Сушильный шкаф

Контрольные вопросы:

1. Лабораторная посуда: правила работы при ее мытье и сушке.
2. Какие правила нужно соблюдать для того, чтобы повысить срок службы хирургических инструментов?
3. Какие методы стерилизации применяют в лаборатории по биотехнологии?
4. Что влияет на выбор способа стерилизации лабораторного инвентаря?
5. Можно ли одним способом стерилизовать весь лабораторный инвентарь?
6. Каким способом стерилизуют стеклянную лабораторную посуду?
7. Каким способом стерилизуют гинекологические и хирургические инструменты?
8. Каким способом стерилизуют резиновые атрибуты?
9. Каким способом стерилизуют хирургическое белье?

Рекомендуемая литература. Для изучения вопросов, касающихся стерилизации обратитесь к таким работам, как И.И.Магда, Оперативная хирургия, Москва, 1990; И.А.Калашник, Практикум по общей ветеринарной хирургии, Москва, 1982, а для знакомства с гинекологическими инструментами – к работам В.С.Шипилова и др., Практикум по акушерству, гинекологии и искусственному осеменению, Москва, 1988.

Глава 4. Животные, как объект исследования

Цель. Изучить биологические особенности лабораторных и сельскохозяйственных животных. Ознакомиться с условиями содержания и кормления животных при постановке опыта.

После изучения главы студент сможет:

- не противоречить международным правилам использования животных в учебных и научных целях;
- соблюдать все меры предосторожности при работе с животными;
- соблюдать правила работы с животными;
- применять анестезирующие фармакологические вещества с соблюдением всех правил по их использованию;
- соблюдать правила по уходу и содержанию животных в подготовительный и послеоперационный периоды работ.

4.1. Лабораторные животные, как объект исследования

Для профессионально подготовленного специалиста применение методов биотехнологии в животноводстве предполагает для студента сегодня, изучение и освоение методов биотехнологии на лабораторных животных. При этом выбор биологического объекта с целью освоения методов биотехнологии определяется изучаемой темой. Так, при проведении эмбриокультуральных исследований желательно работать с лабораторными мышами или морскими свинками (культивирование гамет и эмбрионов, криоконсервация, экстракорпоральное оплодотворение, клеточная селекция), при освоении методов биотехнологии воспроизводства на начальном этапе – с крысами, кроликами (трансплантация эмбрионов) или овцами (искусственное осеменение).

В дальнейшем, когда студент приобретет профессиональную уверенность, необходимо, чтобы он освоил методы трансплантации на сельскохозяйственных животных: при изучении хирургического метода трансплантации желательно работать с овцами или козами, нехирургического – с коровами.

В качестве примера мы рассмотрим три вида животных, которые чаще всего используются в лабораторных экспериментах учебного процесса – это мыши, морские свинки и кролики.

Мышь – это наиболее распространенное лабораторное млекопитающее (рис.4.1.).

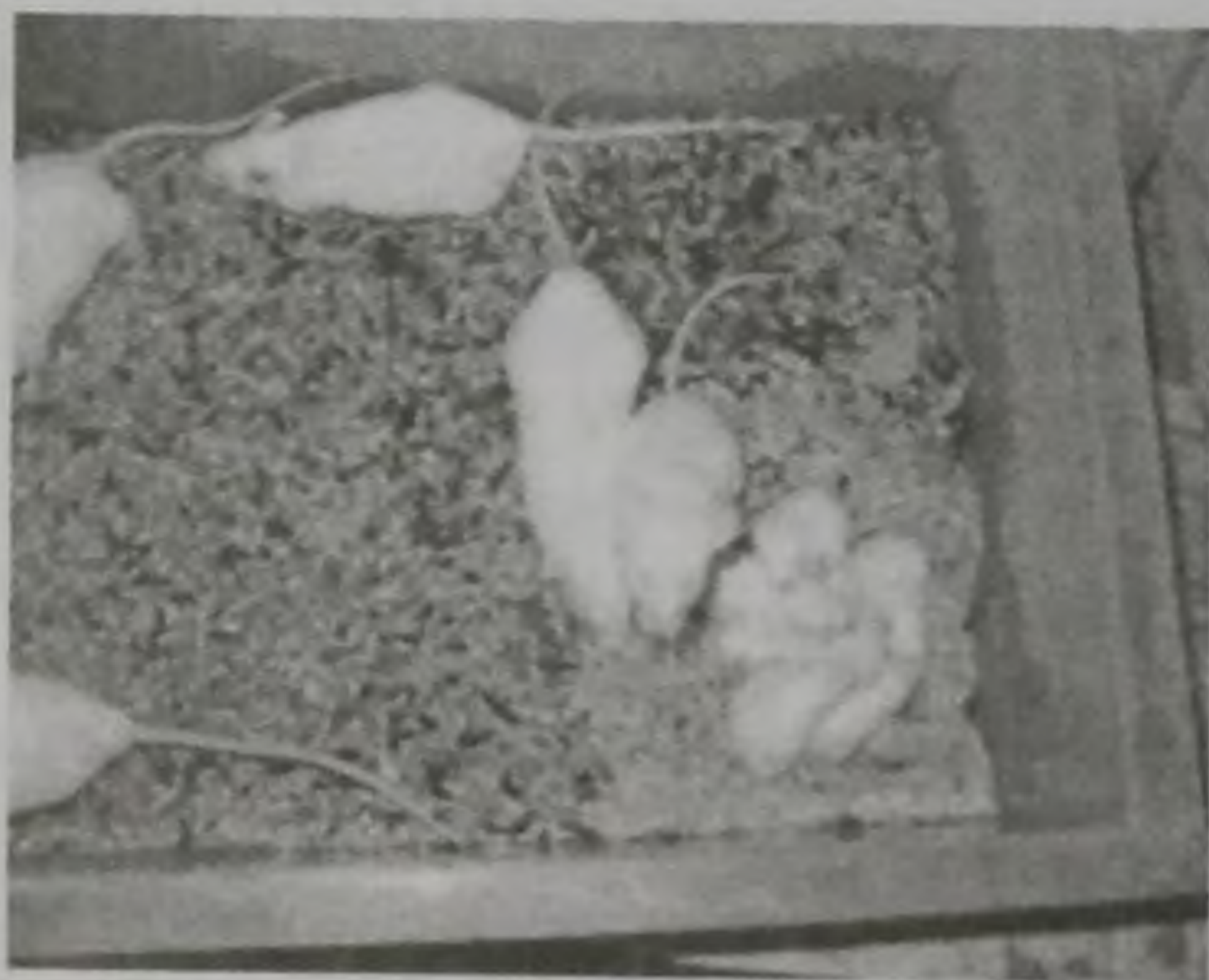


Рисунок 4.1. Лабораторные мыши, содержащиеся в виварии клиники института «Ветеринарии и животноводства» КазНАУ

Разведение. Половая зрелость у мышей наступает в возрасте 30 - 35 дней. Мыши начинают размножаться в возрасте 6-8 недель, длительность репродуктивного периода длится 200 дней. При разведении на 5 – 7 самок выделяется 1 самец. Беременность длится 20 дней. Беременных самок рекомендуют отсаживать в отдельные клетки. Роды обычно наступают ночью. Один помет состоит из 5 – 10 детенышей. За год у мышей бывает 4 – 9 пометов. Взрослые мыши весят: самки – от 18 до 30 г, самцы – от 20 до 35 г. Вес новорожденных составляет 1 – 2 г.

Содержание. В лабораторных условиях их разводят в вивариях. Содержат в клетках площадью 200 см² и высотой 12 см. Размещение – 2 – 3 на клетку. Подстилка – опилки или древесные стружки. Питание: гранулированный корм, который можно приобрести в зоомагазинах. Вода: автоматические поилки.

Среда обитания. Температура: $+21 \pm 2^{\circ}\text{C}$., относительная влажность: $55 \pm 10\%$. Кондиционирование воздуха обязательно. Световой цикл – 12 часов день/ 12 часов ночь.

Подход. Мышь берут за основание хвоста большим и указательным пальцем и переносят ее на решетчатую поверхность. Прижать ее к решетке большим и согнутым указательным пальцем другой руки. Большим и указательным пальцем захватывают кожу шеи за ушками. При этом хвост удерживают безымянным пальцем (можно использовать большой анатомический пинцет).

Умерщвление. В специальной камере, куда нагнетают двуокись углерода.

Эксперименты. Супероуляция. Трансплантация эмбрионов. Клеточные технологии. Эмбриокультуральные исследования.

Морская свинка. В зависимости от состояния, свойства и длины шерстяного покрова различают три группы морских свинок: короткошерстные, жесткошерстные и длинношерстные. Морские взрослые свинки весят: самки – 600 - 1200 г., самцы – 800 – 1800 г.



Рисунок 4.2. Морские свинки, содержащиеся в виварии клиники института «Ветеринарии и животноводства» КазНАУ

Физиологическое развитие морских свинок можно разделить на следующие периоды их жизни: молочное кормление (с 1 по 21 день), неполовозрелый период (25-50 день...51-150 день)) репродуктивный период (6-18...35 - 40 мес), период старческих изменений (3,5 - 5,5 -6(8) лет).

Разведение. Один самец приходится на двух самок. Для размножения используют самок в возрасте 6 - 9 мес., самцов – 6 - 7 мес. Беременность длится 64 дня. Число детенышей в помете составляет от 2 до 4(6). Вес новорожденных составляет 45 - 110 г.

Содержание. Морские свинки содержатся в клетках семьями (1 самец, две самки и приплод; рис.4.2.). Размеры клеток: до 100 см в длину и ширину и до 50 см в высоту. Подстилка - сено или стружка. Питание двух - трех разовое, употребляют зерно, отруби, корнеплоды, сено, свежую траву. Вода - автоматические поилки.

Эксперименты. Супероуляция. Трансплантация эмбрионов. Клеточные технологии. Эмбриокультуральные исследования.

Кролик – к наиболее важным биологическим особенностям домашних кроликов относятся высокая плодовитость, совмещение сукрольности с лактацией, скороспелость и капрофагия.

Разведение. В 4 - 5 - месячном возрасте крольчих можно использовать для воспроизводства. В состояние половой охоты они приходят на 1 - 2-й день после окрола. Половая охота у неоплодотворенных крольчих продолжается в течение 3 - 5 дней и периодически повторяется в теплые периоды года через 5 - 7 суток, а в холодное время - через 8 - 9 суток. За цикл овулирует от 3 до 9 фолликулов. Период беременности продолжается, в среднем, до 30 дней.



Рисунок 4.3. Кролики, содержащиеся в виварии клиники института «Ветеринарии и животноводства» КазНАУ

Крольчихи приносят в помете от 1 до 19 крольчат, чаще 6 – 12. Средняя плодовитость самок многих пород – 7 – 8 крольчат. На 1–2-й день после окрола крольчиха снова приходит в состояние охоты и может быть оплодотворена. В этом случае происходит совмещение сукрольности с лактацией. При использовании уплотненных окролов можно получить от крольчихи за год до 60 – 70 крольчат.

Содержание. В лабораторных условиях кролики разводятся в вивариях и содержатся в клетках

(рис.4.3.). Оптимальные параметры микроклимата: температура – 14 – 16°C, относительная влажность – 60 – 75%; освещенность в клетках – 18 ч. (в период случки), 14 ч. (в период сукрольности и лактации). Питание – для кроликов используют разнообразные корма (концентрированные, грубые, зеленые, сочные). Вода – автоматические поилки.

Эксперименты. Суперовуляция. Трансплантация эмбрионов. Эмбриокультуральные исследования.

4.2. Сельскохозяйственные животные, как объект исследования

В настоящее время среди сельскохозяйственных животных биотехнологические исследования успешно проводятся на крупном рогатом скоте, овцах и свиньях.

Таблица 4.1. Биология сельскохозяйственных животных

№	Показатель	Видовая принадлежность			
		Крупный рогатый скот	Овцы	Свиньи	Лошади
1	2	3	4	5	6
2	Продолжительность хозяйственного использования, лет	8-12	5-8	5-7	20
3	Сроки полового созревания, мес.	7,5	7	6	16
4	Сроки физиологического созревания, мес.	17	14	10	36

1	2	3	4	5	6
5	Вес взрослых животных, кг	500	70	300	550
6	Вес новорожденных, кг	35	3,5	1,5	50
7	Число детёнышей в помёте, гол.	1	1	10	1
8	Продолжительность беременности, дней	285	150	114	340

В этом разделе, с целью избежания повторов, не раскрываются биологические особенности основных видов сельскохозяйственных животных, а лишь приводится таблица 4.1, в которой даются краткие усредненные показатели (без учета пола и породных особенностей).

Для полного изучения этого вопроса рекомендуется обратиться к дополнительной литературе.

Резюме

Необходимо помнить, что все существующие методы биотехнологии используются на биологическом объекте, в нашем случае, это организм животного. Поэтому, работая с животными, будущий специалист - биотехнолог должен при постановке эксперимента соблюдать *правила работы с животными* (как лабораторными, так и сельскохозяйственными):

1. Перед началом экспериментальной работы, следует убедиться в том, что ее методы не противоречат международным правилам использования животных в учебных и научных целях.

2. Соблюдать технические условия эксперимента, которые сводятся к обеспечению основных оборудований, необходимых для опыта.

3. При работе с животными необходимо применять анестезирующие фармакологические вещества с соблюдением всех правил по их использованию.

4. Соблюдать правила по уходу и содержанию животных в подготовительный и послеоперационный периоды работ.

Ключевые слова и понятия:

Кролик

Крупный рогатый скот

Кормление животных

Лабораторная крыса

Лабораторная мышь

Лабораторные животные

Лабораторные эксперименты

Лошади

Морская свинка

Овца

Правила по уходу за животными

Свиньи

Сельскохозяйственные животные

Содержание животных

Контрольные вопросы:

1. Какие биологические особенности характерны для основных видов лабораторных животных?

2. Какие биологические особенности характерны для основных видов сельскохозяйственных животных?

3. В каком возрасте можно использовать для репродукции лабораторных животных в зависимости от их видовой принадлежности?

4. В каком возрасте лабораторные животные в зависимости от видовой и половой принадлежности наиболее активны по репродуктивным качествам?

5. В каком возрасте можно использовать для репродукции сельскохозяйственных животных в зависимости от их видовой принадлежности?

6. В каком возрасте сельскохозяйственные животные в зависимости от видовой и половой принадлежности наиболее активны по репродуктивным качествам?

7. Как содержатся лабораторные животные?

8. Как содержатся сельскохозяйственные животные?

9. Особенности кормления и поения лабораторных животных.

10. Особенности кормления и поения сельскохозяйственных животных.

Рекомендуемая литература. С целью изучения биологических особенностей лабораторных животных рекомендую воспользоваться следующими источниками: В.Ю. Бозаджиев, 2002 (*Хомячки и морские свинки*), Festing M.F.W, 1987 (*International Index of Laboratory Animals*), Small J.D, 1983 (*The Mouse in Biomedical*).

Рекомендуемая литература для изучения биологических особенностей сельскохозяйственных животных мною опускается в связи с наличием этой информации во всех библиотеках сельскохозяйственных ВУЗов.

Глава 5. Лабораторное дело в биотехнологии

Цель: Изучить основы лабораторного дела по биотехнологии в животноводстве и ознакомиться с основными принципами работы при постановке опыта в условиях лаборатории.

После изучения главы студент сможет:

- проводить работу в лабораторных условиях;
- использовать метод лапаротомии с целью осуществления доступа к органам репродукции животных;
- пользоваться микроскопом при работе с гаметам и эмбрионами;
- проводить эмбриокультуральные исследования;
- использовать различные категории питательных сред для клеточных манипуляций;
- подготовить благоприятный режим для сохранения и поддержания жизнедеятельности клеток в условиях *in vitro*.

5.1. Этапы развития по биотехнологии в условиях учебной лаборатории

Особенностью биотехнологических исследований в животноводстве является то, что, во-первых, почти все работы проводятся в лабораторных ус-

ловиях и, во-вторых, методами биотехнологии оказывают воздействие на популяцию животных по двум уровням организации животного организма – молекулярном и клеточном. При этом основным объектом для биотехнологических исследований является клетка животных, так как:

1) изменение генетической программы организма животных на молекулярном уровне предполагает применение рекомбинантной ДНК с целью получения трансгенных животных, что осуществимо при микроклеточном воздействии (трансгеноз) на ядерный аппарат зиготы или сперматозоида животных;

2) биологическое копирование ценных генотипов животных предполагает применение микрохирургических манипуляций с целью получения клонированных и химерных животных, что осуществимо при микроклеточном воздействии (клонирование) на эмбрионы и ядерный аппарат яйцеклетки (энуклеированная яйцеклетка) животных;

3) создание высокоценных племенных стад, которые будут обладать важными «сконструированными» хозяйственно-полезными признаками, предполагает использование методов воспроизводительной биотехнологии с целью получения животных трансплантатов, что осуществимо при клеточном воздействии (трансплантация эмбрионов) на организм животных.

Поэтому именно методами биотехнологии можно изменить генетическую программу всей популяции животных. И такая корректировка в племенном животноводстве осуществляется путем использования методов молекулярной и клеточной биотехнологии.

Следовательно, специалисту - биотехнологу очень важно правильно координировать свою работу в лаборатории и профессионально осуществлять основные этапы работ, которые входят в эксперимент – это:

- получение ооцитов и эмбрионов путем вымывания их из гениталий суперовулированных самок - доноров;
- создание гаметам и эмбрионам благоприятных условий *in vitro*;
- возможность применения эмбриокультуральных исследований, направленных на изыскание и раскрытие биотехнологического резерва животных на уровне репродуктивных клеток;
- пересадка эмбрионов в генитальный аппарат самок -реципиентов для получения трансплантатов.

Из всего вышеизложенного следует, что изучение основ лабораторного дела по биотехнологии в животноводстве предполагает освоение двух методов: метода лапаротомии, важного для осуществления доступа к органам репродукции и витального метода, важного для исследования живых репродуктивных клеток животного происхождения. А это значит, что завершающим этапом любого биотехнологического эксперимента в животноводстве является получение трансплантата. Ведь какие бы манипуляции не проводились с эмбрионами *in vitro*, и какие бы сверхъестественные особенности не рекламировались для «сконструированного» эмбриона, о результатах можно судить только по рожденному трансплантату, а именно после тщательного молекулярного, биохимического и селекционного анализов, которому подвергнется трансплантат после своего рождения.

5.2. МЕТОД ЛАПАРОТОМИИ

Прежде чем начать экспериментальную работу, следует убедиться в том, что ее методы не противоречат национальным и международным правилам использования животных в научных и учебных целях. Поэтому при проведении учебных экспериментов на лабораторных животных следует соблюдать следующие правила: 1) придерживаться всех требований по содержанию, уходу и кормлению животных в условиях вивария; 2) соблюдать технические условия эксперимента, которые сводятся к обеспечению основных оборудования, необходимых для постановки опыта и 3) применять совершенные способы анестезии.

Как уже было отмечено, главным этапом в биотехнологии животных является получение трансплантата, для которого было бы свойственно наличие измененной биопрограммы. Такой трансплантат получают, либо с помощью методов эмбриокультуры (экстракорпоральное оплодотворение, культивирование, криоконсервация), либо с помощью методов эмбриоинженерии (химерный, клонированный и трансгенный организм животного). Поэтому важно изучение методов, которые предполагают, во-первых, получение доступа к органам репродукции (матка, фаллопиевы трубы и яичник) с целью извлечения или пересадки эмбрионов; во-вторых, проведение эмбриокультуральных исследований с целью оценки, селекции и отбора гамет и эмбрионов и, в-третьих, освоение методов эмбриоинженерии с целью "конструирования" новых генотипов животных.

При работе с лабораторными животными доступ к органам репродукции осуществляют только с помощью хирургического метода – лапаротомии по белой линии живота. При проведении лапаротомии различают три этапа работ: подготовительный, собственный метод, послеоперационный.

Следовательно, работа по биотехнологии животных при проведении учебного эксперимента в условиях лаборатории предполагает использование лабораторных животных и состоит из следующих основных этапов:

1. Подготовительный период. Период, когда животное подготавливают к операции, называется *предоперационным*. Основная часть работы данного периода – санитарная обработка, обследование и подготовка животного к операции.

1. Регистрация самок в журнале учета.

Проведение работ по биотехнологии трансплантации эмбрионов определяется назначением самки. Самок в зависимости от назначения делят на две группы. В первую группу относят самок – доноров, во вторую – самок – реципиентов. От самок – доноров получают при вымывании ооциты и эмбрионы, а от самок – реципиентов при пересадке – трансплантатов. Следовательно, связующим звеном между донорами и реципиентами являются эмбрионы.

При биотехнологии трансплантации с самками – донорами проводят следующие обязательные мероприятия: 1) гормональное воздействие с целью вызывания полиовуляционной реакции (суперовуляция); 2) осеменение; 3) извлечение эмбрионов.

С эмбрионами животных проводят обязательные и дополнительные мероприятия. К обязательным процедурам относят: оценка, селекция и отбор, а к дополнительным – культивирование, криоконсервация, клонирование и трансгенез.

Для самок – реципиентов обязательными мероприятиями являются: 1) синхронизация эструса по отношению к эструсу донора и 2) пересадка эмбрионов.

2. Выдержка самок лабораторных животных на голодной диете в течение 6 – 12 часов.

Для этой цели самки за день до эксперимента помещаются в питомник кафедры. Особенностью содержания лабораторных самок в питомнике является то, что они имеют доступ только к воде (через автопоилки). Голодная диета для самок предназначена для того, чтобы освободить кишечник от содержимого с целью проведения операции.

Поэтому система мероприятий, проводимых до операции с целью предупреждения осложнений, называется подготовкой животного к операции.

II. Метод лапаротомии. Лапаротомия – это вскрытие брюшной полости для осуществления доступа к органам репродукции.

При работах, связанных с методом лапаротомии важно учесть главное требование, которое обеспечит успешную работу – это соблюдение правил асептики. Асептика – способ борьбы с хирургической инфекцией, основанный на предупреждении попадания микробов в рану путем полного обеззараживания всех предметов, которые соприкасаются с раной. Предметы обрабатываются в основном физическими способами – длительным воздействием высокой температуры.

Полное обеззараживание операционного белья, инструментария, перевязочного материала, перчаток и др., предупреждает попадание инфекции в рану, следовательно, и ее нагноение.

Последовательность работ при лапаротомии зависит от способа вымывания эмбрионов. При убое самок – доноров последовательность работ складывается из следующих процедур: умерщвление, дезинфекция, фиксация животного на операционном столе, подготовка операционного поля и разрез с целью извлечения органов репродукции (яичники, фаллопиевы трубы и матка), вымывание эмбрионов. При хирургическом методе вымывания или пересадки эмбрионов работа складывается из следующих этапов: фиксация, обезболивание, подготовка операционного поля, разрез по белой линии живота с целью доступа к органам репродукции, вымывание или пересадка эмбрионов, соединение тканей путем наложения шва.

Последовательность работ при лапаротомии на лабораторных животных:

1. Умерщвление.

Мышь легко забить смещением шейных позвонков, для чего:

а) возьмите мышь за основание хвоста большим и указательным пальцем и перенесите ее на любую поверхность, в которую она может вцепиться (например, решетка крышки);

b) осторожно, оттягивая мышь назад за хвост, прижать ее к решетке большим и согнутым указательным пальцами другой руки;

с) крепко зацепите шею и одновременно потяните за основание хвоста.

Если нужно забить много мышей, пользуются специальной камерой-контейнером, наполненной двуокисью углерода.

2. Дезинфекция.

Погрузить мышь в стакан с дезинфицирующей жидкостью, промокнуть и перенести на стерильную поверхность.



Рисунок 5.1. Фиксация лабораторной мыши (или крысы) на парафиновых подставках

0,6 мг трибромозетанола или 0,04 мл фентанилфлюанизона на 5 г животного.

5. Подготовка операционного поля.



Рисунок 5.2. Подготовка операционного поля

3. Фиксация животного.

Этот этап обеспечивает условия для безопасного оперирования.

Лабораторных мышей фиксируют с помощью тесемок (или игл после убоя) на парафиновых подставках, морских свинок и кроликов – на операционных столах, которые специально оборудованы для мелких животных (рис. 5.1.).

4. Обезболивание.

В качестве анестетиков применяют пентобарбитон, трибромозетанол и фентанилфлюанизон. Инъекцию проводят внутрибрюшинно из расчета 0,2 мг пентобарбитона,

Работа осуществляется в 4 этапа:

1) мытье и удаление волосяного покрова сбриванием (рис. 5.2.);

2) механическая очистка с обезжириванием, для чего кожу протирают в течение 1-2 мин. стерильным марлевым тампоном, пропитанным 0,5% - ным раствором нашатырного спирта обязательно в направлении от центральной части к периферии;

3) дублирование и дезинфекция осуществляется 5% - ной настойкой йода дважды (первое – после механической очистки и второе – перед разрезом);

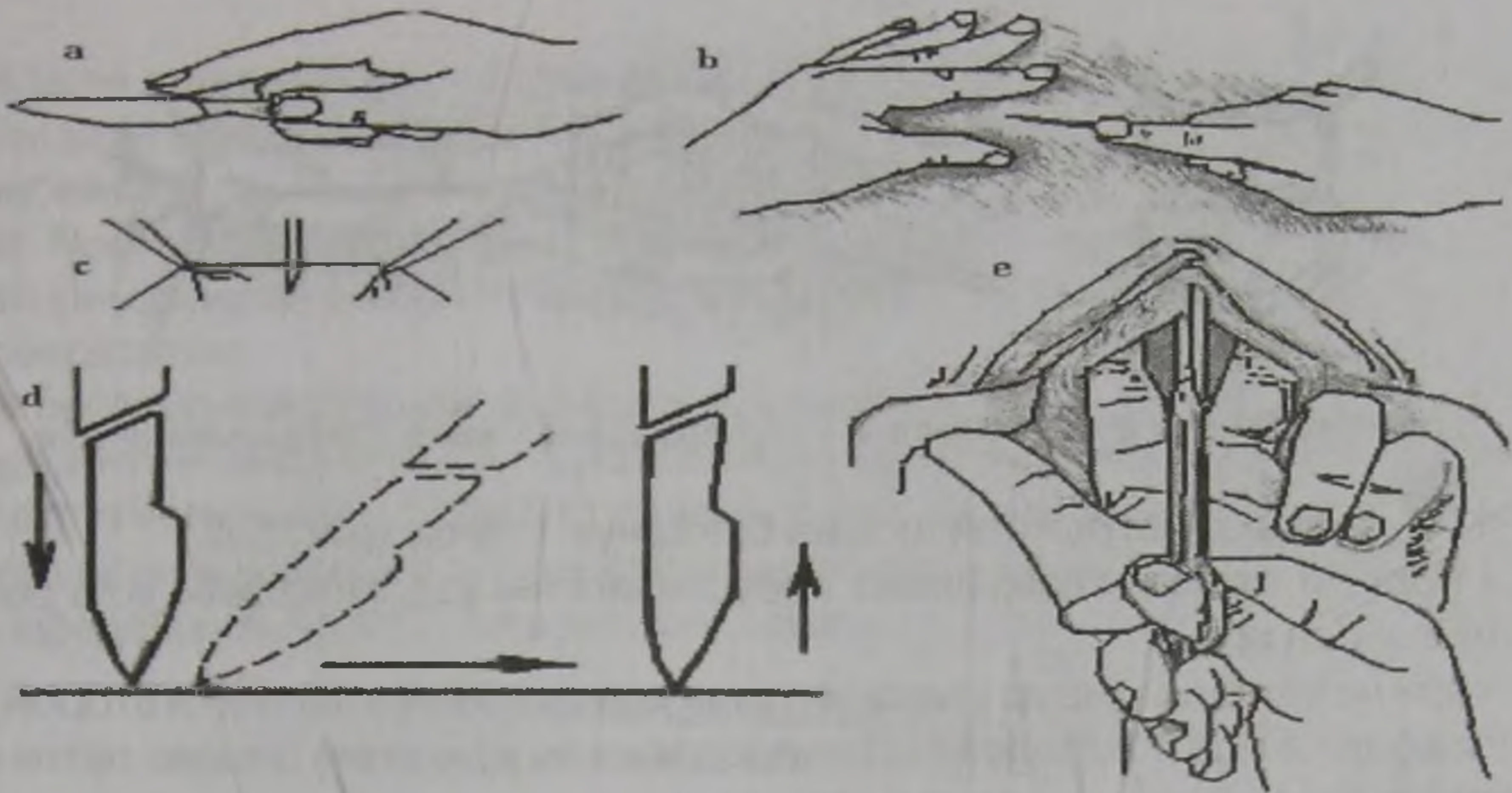


Рисунок 5.3. Хирургический разрез брюшины.

а – способ держания скальпеля; б – способ фиксации кожи пальцами; с – способ фиксации кожи пинцетом; д – положение лезвия скальпеля при разрезе кожи; е – рассечение брюшины между двумя пальцами.

4) изоляция операционного поля с помощью хирургических простыней (или салфеток).

6. Разрез с целью доступа к гениталиям.

Разрез выполняют с помощью брюшистого скальпеля и хирургических ножниц. Длина разреза для мышей составляет примерно 2 – 3 см, морских свинок и крыс – 3 – 4 см, кроликов – 6 – 8 см. При этом разрез необходимо проделывать в следующей последовательности (рис.5.3.):

1) устраняют подвижность и смещаемость кожи путем ее фиксации пальцами левой руки или пинцетом;

2) скальпель ставят вертикально для осуществления прокола;

3) наклоняют скальпель и его брюшком разрезают кожу;

4) заканчивают разрез, ставя скальпель снова вертикально.

При выполнении разреза необходимо соблюдать следующие правила: 1) ткани разъединяют послойно; 2) разрез производят поверхностный, длинный и неглубокий; 3) при выполнении разреза пользуются брюшистым скальпелем, ножницами, пинцетом и для защиты внутренностей – желобоватым зондом.

7. Вымывание или пересадка эмбрионов при трансплантации.

Для выполнения этих процедур пользуются специальными катетерами, которые подсоединяются к шприцам и предназначены либо для вымывания, либо для пересадки.

8. Соединение тканей путем наложения шва.

Для этой цели используют кетгутовую нить. Нить вводят в хирургическую иглу и пропускают через мягкие ткани с целью их соединения в следующей последовательности:

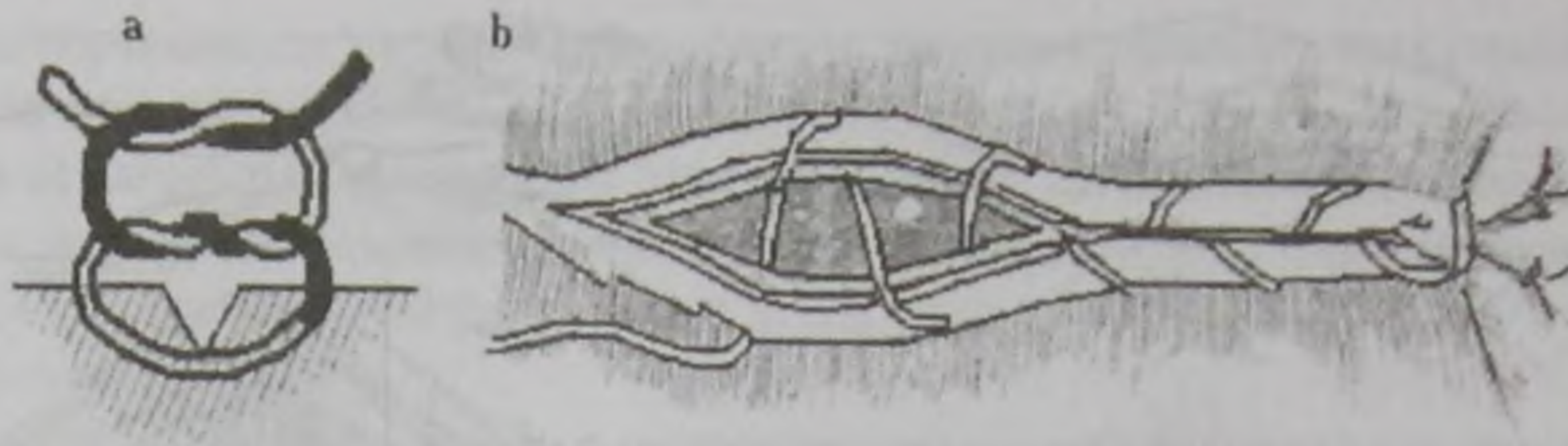


Рисунок 5.4. Соединение тканей: а – хирургический узел; б – непрерывный шов.

1) выполняют погружной шов на брюшную стенку (рис.5.4.):

- первый стежок завязывают хирургическим узлом вблизи угла раны в месте выхода иглы;
- при наложении хирургического узла концы нитей в первой и второй петле проводят в противоположных направлениях, при этом первая петля осуществляется двойным перекручиванием;
- последующие стежки накладывают на одинаковом расстоянии от краев раны, делая вкол со стороны слизистой оболочки;
- для предупреждения ослабления нити, помощник при каждом уколе иглы подхватывает нить и слегка ее натягивает, обеспечивая плотное и равномерное сопоставление краев раны;



Рисунок 5.5. Метод лапаротомии. Студенты 5 курса специальности 450740-«Селекция и биотехнология в животноводстве» на лабораторном занятии выполняют процедуру по вымыванию эмбрионов у лабораторных крыс (оперирует Маматкулова А., ассистирует Усилбаева А).

- на последнем стежке через края раны протягивают двойной конец нити и связывают его с одинарным;

2) накладывают шов на кожу двумя способами: в первом случае выполняют прерывистый узловый шов; во втором – шов по Ламберу, обеспечивая высокий уровень герметичности.

Таким образом, применение метода лапаротомии в биотехнологии воспроизводства лабораторных животных имеет свои особенности, и методика зависит от способа вымывания эмбрионов.

ных животных имеет свои особенности, и методика зависит от способа вымывания эмбрионов.

В этой главе не рассматривается методика, связанная с вымыванием и пересадкой эмбрионов (рис.5.5.). Данная тема подробно излагается в 9 главе учебника.

III. Послеоперационный период. После операции анестезированных лабораторных животных нужно держать под лампой, пока действие анестетика не прекратится.

В послеоперационный период в течение недели животные содержатся в виварии в отдельных клетках. В этот период наблюдают за его общим состоянием. В последующие 7-15 дней (это период, равный двум половым циклам; срок зависит от видовой принадлежности) ведут наблюдение за реципиентами с целью определения приживляемости пересаженных эмбрионов.

5.3. Витальный метод изучения репродуктивных клеток животных

Витальный метод изучения репродуктивных клеток и эмбрионов животных основан на исследовании живой клетки. Для использования витального метода исследования репродуктивных клеток животных необходимо наличие питательной среды и микроскопа.

Питательная среда. После извлечения из репродуктивного тракта гамет и эмбрионы помещаются в питательную среду (в «культуру»). При этом питательная среда должна полностью обеспечивать все внешние условия, которые имелись при условиях *in vivo*, так как только в этом случае возможно сохранение их жизнедеятельности, обеспечение факторов для созревания гамет, их оплодотворения и дальнейшего эмбрионального развития.

Таблица 5.1. Ингредиенты, входящие в состав сбалансированного солевого раствора Эрла для культивирования эмбрионов и ооцитов *in vitro*

Состав	Характеристика
EBS	Сбалансированный солевой раствор Эрла, в 10 - кратной концентрации, без бикарбоната натрия
Вода	Дистиллированная
Бикарбонат натрия	В виде раствора
Пируват натрия	Основной раствор 1,1 мг/мл
Пенициллин	600 мг/мл
Гентамицин	10 мг/мл
Гепарин	0,2 мл, содержащие 5000 МЕ.
БСА	См. табл.5.5
HEPES	5,96 г/100 мл

Среда, обеспечивающая рост и развитие биологических систем благодаря наличию в своем составе компонентов, необходимых для нормальной жизнедеятельности клеток, называется питательной (культуральной). По химическому составу питательная среда, в среднем, состоит из 80 – 90 % воды, 10 – 15% белка, 2% липидов, 1% углеводов, 1% нуклеопротеидов, 1 - 1,5% неорганических веществ.

Основными требованиями при подготовке питательных сред являются растворимость компонентов, отсутствие токсичности и стабильность. При

эмбриокультуральных исследованиях в животноводстве питательная среда выполняет следующие важные функции:

1. Обеспечивает питательными веществами, гормональными факторами развития, ферментами, витаминами, транспортными белками, липидами, минеральными компонентами, так как они все в комплексе необходимы для нормальной жизнедеятельности клеток.

2. Создает физико-химические условия для полноценного развития (рН, осмолярность).

Среды можно приобрести в готовом виде. Выпускаются они в жидком виде (в десятикратной концентрации), или в форме порошка (EBS, F10). Однако многие исследователи готовят среды самостоятельно, поскольку это дает возможность контролировать каждый ингредиент.

Таблица 5.2. Среда для промывания фолликулов и работы с эмбрионами	
Состав	Процедура
<i>А. Для приготовления 400 мл EBS, забуференного HEPES без антибиотика</i>	
Пируват натрия	1.1 мг/мл
Бикарбонат натрия	0.1348 г растворить в 20 мл воды
EBS	В 295 мл воды добавить 40 мл EBS. 1.1 мг/мл пирувата натрия; затем медленно (для предотвращения образования осадков) пипеткой добавить раствор бикарбоната натрия, осторожно встряхивая. Полученный раствор должен быть прозрачным.
HEPES	Ввести 33.6 мл
Проверить режим полученной среды: осмолярность, рН, t.	
<i>В. Среда для получения ооцитов</i>	
Гепарин	350 мкл гепарина добавить к 350 мл EBS, забуференного HEPES. Стерилизовать миллипоровой фильтрацией.
<i>С. Приготовление среды для переноса эмбрионов</i>	
Сыворотка, табл. 5.5	2 мл инактивированной нагреванием сыворотки добавить к 18мл HEPES. Стерилизовать фильтрацией.

В лабораторных условиях питательные среды готовят в 1-литровом объеме. При этом ингредиенты растворяют примерно в 700 – 800 мл воды. Соли растворяют в той последовательности, что приведено в рецепте. После окончания процедур, связанных с растворением ингредиентов, объем раствора доводят до 1 л и, после чего, проводят его стерилизацию под давлением через миллипоровые фильтры или автоклавированием (1 атм, t = 115°C; в течение 20 – 35 мин.). После охлаждения через раствор бикарбоната натрия пропускают CO₂. Сыворотка, белковые добавки (например, инсулин и др. гормоны) хранятся при температуре минус 20°C и добавляются непосредственно перед использованием.

В зависимости от химического состава различают три категории сред:

1. Среды с сывороточными добавками. Клетки выращиваются в основ-

ной среде, содержащей небольшое количество сыворотки и обогащенной сывороточными добавками.

2. Среды с заменителями сыворотки. Клетки выращиваются в основной среде, в которую добавлены определенные заменители сыворотки.

3. Бессывороточные, которые, в свою очередь, подразделяются на три подгруппы:

а) простые (белки отсутствуют); б) специальные (содержат очищенные белки, гормоны, ферменты, витамины); в) неопределенные (экспериментальные среды, в составе которых имеются "неопределенные" биологические добавки).

Таблица 5.3. Среда для оплодотворения in vitro	
Ингредиент	Процедура
<i>А. Для получения 100 мл исходного раствора EBS, забуференного бикарбонатом</i>	
Пируват натрия	Основной раствор 1,1 мг/мл
Бикарбонат натрия	0,21 г растворить в 10 мл воды
EBS	К 10 мл десятикратного раствора добавить 77 мл воды, пируват натрия: после чего медленно внести с помощью пипетки раствор бикарбоната натрия, осторожно встряхивая (важное условие – раствор должен получиться прозрачным)
Антибиотики	Добавить 10 мкл раствора пенициллина и 0,2 мл раствора гентамицина
<i>В. Приготовление среды для оплодотворения in vitro</i>	
БСА	0,4 г (табл.5.5) + 80 мл EBS и оставить для естественного постепенного растворения. Профильтровать через миллипоровые фильтры.

Рецепты сред, основанных на EBS, представлены в таблицах 5.1. – 5.4.

Таблица 5.4. Среда для культивирования эмбрионов	
EBS	0,4 мл + 0,4 мл инактивированной сыворотки. Профильтровать через миллипоровые фильтры. Использовать по 100-500 мкл под маслом для культивирования эмбрионов, начиная со стадии пронуклеусов.

Таблица 5.5. Приготовление сыворотки материнской крови	
Ингредиент	Процедура
Кровь	10-15 мл Центрифугировать немедленно в настольной центрифуге 5-10 мин. при 1000g. Воспользовавшись пастеровской пипеткой перенести плазму в стерильную пластиковую пробирку. Оставить пробирку с плазмой для свертывания. Убрать фибриновый сгусток. Инактивировать нагреванием в водяной бане при 56°C в течение 30 мин. Профильтровать. Остаток можно заморозить.

Среды, в составе которых компоненты, необходимые для поддержания жизни, роста и развития сведены до минимума, относят к минимальным.

Среди биологических сред наибольшее распространение получила сыворотка, т.к. она пригодна для культивирования клеток вне организма. Добавление 5 – 20% (по объему) сыворотки все еще остается необходимым для поддержания роста и развития клеток (табл.5.5.).

В питательной среде сыворотка выполняет следующие функции: служит буфером для лабильных и водонерастворимых питательных веществ; нейтрализатором токсинов; поставщиком гормонов, пептидных факторов роста, незаменимых питательных низкомолекулярных веществ и, кроме того, сыворотка обладает защитным эффектом.

В зависимости от назначения питательные среды также делят на четыре группы: 1) среды, используемые для культивирования гамет (среда Хэнкса, Тироде); 2) среды, используемые для оплодотворения гамет (среда Т6, раствор Кребса-Рингера), 3) среды, используемые для культивирования эмбрионов (среда Виттена) и 4) среды используемые для замораживания гамет и эмбрионов (PB1, M2; табл.5.6.).

Основной режим питательной среды для культивирования гамет и эмбрионов должен быть следующим:

1) осмотическое давление находится в пределах 280-290 мОсмоль/л. Если клетку содержать в среде с превышающим ее уровень осмотическим давлением – она будет сжиматься и сморщиваться, если же наоборот – клетка будет набухать и разрываться.

2) температура считается оптимальной в пределах 37-37,5°C;

3) pH находится в пределах 7,2 (при культивировании) и 7,4 (при оплодотворении);

4) наличие в воздухе 5% CO₂, а в смеси – 5% кислорода, 90% азота, 5% углекислого газа (для этой цели среду необходимо эквilibрировать).

Таблица 5.6. Состав основных питательных сред

№	Компонент	Среда, г/л		
		Т6	Виттена	PB1
1	NaCl	5,719	4,140	8000
2	KCL	0,106	0,356	0,200
3	MgCl ₂ ·6H ₂ O	0,096	-	-
4	Na ₂ HPO ₄ ·12 H ₂ O	0,129	-	2,898
5	CaCl ₂ ·2 H ₂ O	0,262	-	0,132
6	KH ₂ PO ₄	-	0,162	0,200
7	MgSO ₄ ·H ₂ O	-	0,294	-
8	NaHCO ₃	2,101	-	-
<i>Добавки (вводятся непосредственно перед работой):</i>				
9	Лактат натрия	2,791	6,235	-
10	Пируват натрия	0,052	0,036	0,036

№	Компонент	Среда, г/л		
		Т6	Витгена	РВ1
11	Лактат кальция	-	0,527	-
12	Глюкоза	1,0	1,0	1,0
13	БСА	-	3,0	3,0
14	Стрептомицин	0,050	0,05	-
15	Пенициллин	0,060	0,075	0,060
16	Феноловый красный	0,010	-	0,010

Микроскоп. Устройство оптических приборов основано на законах преломления и отражения света, которые известны из курсов физики. На этом останавливаться здесь мы не будем и ограничимся только кратким описанием частей микроскопа.

Оптическая система микроскопа, составляющая его основу, представлена двумя системами линз: а) объектив – обращен к объекту, дает изображение увеличенное, но обратное; б) окуляр – обращен к глазу исследователя, увеличивает изображение, но делает его мнимым, оставляя обратным.

Таким образом, в результате совместного действия обеих систем линз изображение получается увеличенное, обратное и мнимое. Объектив и окуляр заключены в металлическую трубку – тубус, нормальная длина которого равна 160 мм. Современный микроскоп имеет несколько объективов с разным увеличением. Они закреплены в металлической оправе, называемой револьвером.

Помимо оптической системы, в микроскоп входят зеркало, предметный столик и осветитель. Зеркало помещается в нижней части штатива микроскопа. Оно служит для отражения лучей, падающих на него от источника света, в сторону исследуемого объекта. С одной стороны зеркало вогнутое, с другой – плоское. Для более интенсивного освещения пользуются вогнутым зеркалом.

Предметный столик служит для помещения на нем исследуемого объекта. Через отверстие в середине столика проходит пучок лучей, отбрасываемый зеркалом. Пройдя через объект, они попадают в объектив. Освещение можно регулировать увеличением или уменьшением отверстия в столике. Это достигается при помощи *диафрагмы*, которая укрепляется с нижней стороны предметного столика.

Осветитель - конденсор предназначен для усиления света. Он состоит из линз, которые собирают лучи, отбрасываемые от зеркала, и концентрируют их на исследуемом предмете. Помещается конденсор между зеркалом и предметном столиком.

Замечательным орудием современного научного исследования, позволяющим более точно изучать строение живого вещества клеток и тканей, является электронный инвертированный микроскоп. Если оптический микроскоп позволяет получить увеличение исследуемого объекта в несколько тысяч раз, то электронные инвертированные микроскопы могут давать увеличения в десятки - сотни тысяч раз.

Принцип действия электронного микроскопа схож со световым микроскопом. В электронном микроскопе пучок световых лучей также направляется линзой конденсатора через образец, а полученное изображение увеличивается с помощью линз. В таблице 5.7. суммированы некоторые сходства и различия между этими микроскопами.

Таким образом, световые бинокулярные и электрические инвертированные микроскопы позволяют видеть живые клетки, а питательная среда – сохраняет жизнедеятельность репродуктивных клеток животных *in vitro*. Поэтому для кратковременного наблюдения за клетками их помещают в жидкую среду на предметное стекло или чашку Петри. При длительном наблюдении за клетками пользуются специальными камерами – это или плоские флаконы с отверстиями, закрытыми тонкими стеклами, или же плоские разборные камеры. В качестве объектов можно использовать гаметы и эмбрионы животных, при этом их изучают в специально подобранных средах.

Наблюдения за гаметами и эмбрионами обычно регистрируются в виде фотографий, сделанных с помощью специальных фотонасадок к микроскопу. Живые клетки можно снимать и на видеокамеру. В ряде случаев такая

Таблица 5.7. Сравнение светового и электронного микроскопов (показатели усреднены)

Показатель	Электронный микроскоп	Световой микроскоп
Источник излучения	Электроны	Свет
Длина волны	0,005 нм при 50 кВ	400-700 нм
Полезное максимальное увеличение	x 250000 (на экране)	x 150
Максимальное разрешение	0,5 нм	200-500 нм
Линзы	Электромагниты	Стеклянные
Объект	Не живой, обезвоженный относительно маленький или тонкий; удерживается на маленькой сетке в вакууме (трансмиссионный микроскоп). Живой, который лежит в чашках Петри и предназначен для различных микроманипуляций (инвертированный микроскоп)	Живой или неживой. Обычно лежит на предметном стекле
Распространенные красители	Содержат тяжелые металлы, которые отражают электроны (трансмиссионный микроскоп)	Цветные красители
Изображение	Обычно черно - белое	Обычно цветное

микрокиносъемка дает очень важную информацию. Применяя ускоренную или замедленную киносъемку, можно видеть протекание таких важных процессов, как деление клеток, фагоцитоз, течение цитоплазмы, слияние клеток, т.е. оплодотворение и т.д. В настоящее время широко практикуется конструкция, состоящая из микроскопа и компьютера, при программном обеспечении которого исследователь получает полную информацию от любого биологического объекта.

Особенности витального метода изучения репродуктивных клеток в биотехнологии следующие:

1. Возможность проведения фундаментальных исследований с целью изучения таких биологически неповторимых и уникальных процессов как развитие гамет и их оплодотворение, развитие предимплантационных эмбрионов.
2. Возможность регулирования биологических процессов *in vitro* с помощью различных факторов развития.
3. Возможность «конструирования» на уровне молекул, ядер или клеток с целью получения организмов, обладающих особым генотипом.
4. Возможность регулирования процессов репродукции с целью влияния на популяцию животных.

Резюме

Изучение и освоение методов биотехнологии возможно на лабораторных животных. Биотехнологический эксперимент в животноводстве, в свою очередь, предполагает применение методов эмбриотрансплантации, эмбриокультуры и эмбриоинженерии.

Освоение методов биотехнологии репродуктивных клеток на лабораторных животных основано на применении метода лапаротомии. Поэтому необходимо изучение основ хирургии. В свою очередь, для успешной имплантации пересаженного эмбриона необходимым условием является применение методов эмбриокультуры. Оценка, селекция и отбор биологически полноценных эмбрионов с целью их пересадки осуществимо только в питательной среде с использованием микроскопа. Без последнего применение эмбриокультуральных методов невозможно. Вышеперечисленные обстоятельства и определяют содержание этой главы. Для детального изучения вопросов, раскрываемых в этой главе, заинтересованным читателям рекомендую обратиться к дополнительным источникам.

Ключевые слова и понятия:

In vitro

In vivo

Витальный метод

Газация

Категории питательных сред

Лапаротомия

Микроскоп

Осмолярность

Питательная среда

Раствор Тироде

РВ I

Режим питательной среды

pH

T6

Контрольные вопросы:

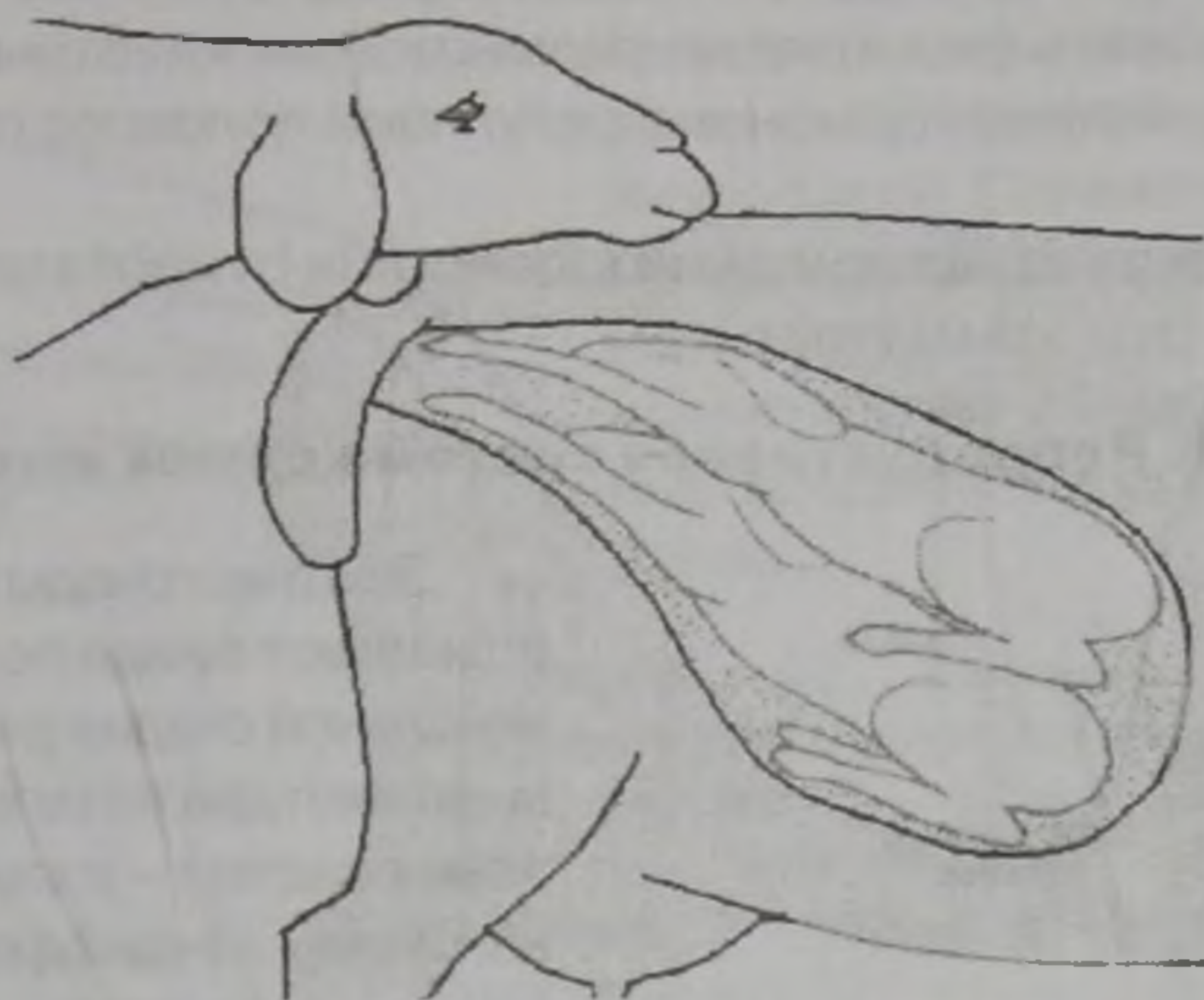
1. Какие этапы работ проводят в исследованиях по биотехнологии в лабораторных условиях?
2. Почему нужно соблюдать правила работы в лаборатории?
3. Почему важно изучение метода лапаротомии?
4. Что собой представляет операционное поле?
5. Какие этапы работ проводят при подготовке операционного поля к операции?
6. Что является необходимым условием для животного при использовании метода лапаротомии?
7. Какой метод называют витальным?
8. Для чего используют микроскоп?
9. Можно ли обойтись без микроскопа?
10. Для чего используют питательную среду?
11. Можно ли обойтись без питательной среды?
12. Что является главной оптической частью микроскопа?
13. Строение светового микроскопа.
14. Что является главной характеристикой микроскопа?
15. От чего зависит разрешение микроскопа?
16. Основные отличия светового и электронного микроскопов?
17. Методы подготовки биологического материала для электронной и световой микроскопии.

Рекомендуемая литература. При изучении вопросов, касающихся правил работ в лаборатории по биотехнологии советую обратиться к научным журналам по молекулярной биологии и биотехнологии.

Для изучения вопросов, касающихся основ хирургии обратитесь к таким работам, как И.И.Магда, Оперативная хирургия, Москва, 1990; И.А.Калашник, Практикум по общей ветеринарной хирургии, Москва, 1982.

При освоении методов витального изучения клеток животных Вам помогут работы Johnson M.H. (1981). J. Cell Biol., 303; Gates A.H. (1991). In: Methods in Mammalian Embryology.

ЧАСТЬ II. ЭМБРИОТРАНСПЛАНТАЦИЯ



Одним из главных составных частей общей технологии трансплантации является получение полноценных эмбрионов у самок - доноров.

Трансплантация эмбрионов в животноводстве – это биотехнологический метод воспроизводства, позволяющий при суперовуляции получать максимальное число жизнеспособных эмбрионов от самок – доноров в целях пересадки их в генитальный аппарат реципиентов.

Разработка методов биотехнологии воспроизводства путем трансплантации эмбрионов ведется на нескольких уровнях:

- 1) выявление эффективных методов трансплантации эмбрионов с целью внедрения их в практическую деятельность;
- 2) проведение эмбриокультуральных исследований в животноводстве;
- 3) проведение эмбриоинженерных исследований в животноводстве.

Целью трансплантации эмбрионов в животноводстве является ускоренное размножение ценных генотипов животных.

Сущность метода трансплантации сводится к гормональному воздействию самок – доноров с целью вызывания суперовуляции, осеменению их по приходу в охоту, извлечению оплодотворенных яйцеклеток из генитального аппарата, эмбриокультуральным и эмбриоинженерным исследованиям (культивирование, оценка, селекция и отбор жизнеспособных эмбрионов) с дальнейшей пересадкой в гениталии реципиентов.

Глава 6. Основы биологии размножения животных

Цель: Изучить физиологическую сущность и морфологическое строение половых органов животных.

После изучения главы студент сможет:

- раскрыть биологическую сущность репродуктивной системы животных;

- дать разъяснение морфогенезу генитального аппарата в зависимости от видовой и половой принадлежности животных;
 - охарактеризовать физиологию размножения животных;
 - объяснить действие гормонов в регуляции полового поведения животных;
- объяснить работу гонад при взаимодействии с гипоталамусом и гипофизом животных.

6.1. Репродуктивная система самок животных

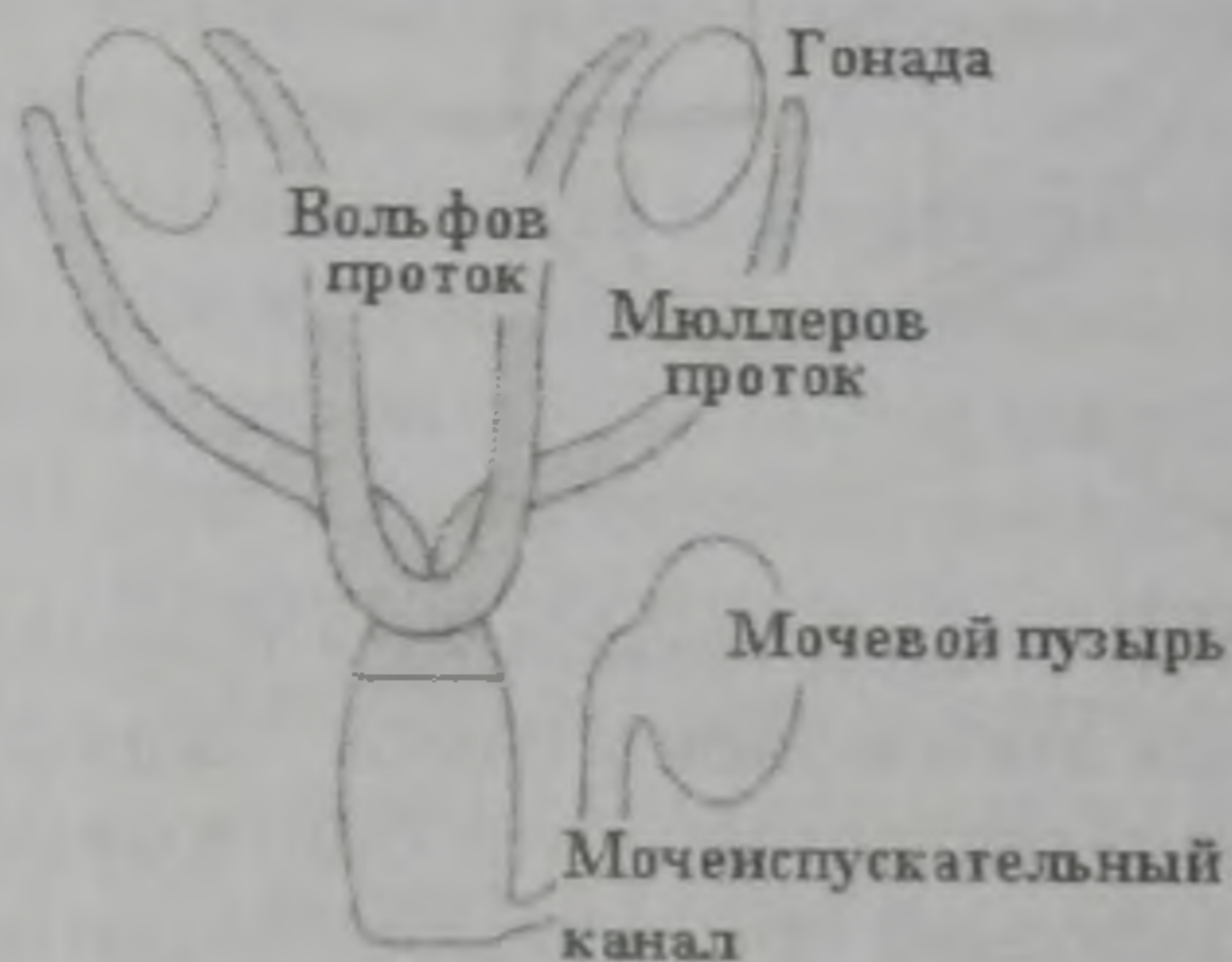


Рисунок 6.1. Недифференцированная стадия развития половых органов животных (XX или XY).

Зачатки гонады у млекопитающих возникают в виде половых валиков. На начальной стадии развития зародыша выделяют два типа первоначальных половых систем – вольфовы и мюллеровы каналы. Индифферентная закладка гонады у млекопитающих биопотенциальна, так как она может становиться либо тестикулом, либо яичником в зависимости от наличия или отсутствия Y – хромосомы. Женские внутренние половые органы образуются из мюллеровых протоков при редукции вольфовых (для мужской половой системы наоборот; рис. 6.1.).

Биологическая сущность полового аппарата сводится к созданию и поддержанию первичных и вторичных половых признаков с целью обеспечения репродуктивной активности животных.

Биологическая сущность половой системы самок животных сводится к образованию и созреванию яйцеклеток, в получении через половой акт сперматозоидов и созданию благоприятных условий для успешного оплодотворения гамет, дальнейшего внутриутробного развития плода и его рождения с последующим кормлением в молочный период развития.

Половые органы самок делят на наружные и внутренние. К наружным половым органам относят вульву, клитор и преддверие влагалища. Вульва состоит из двух половых губ и вертикально расположенной между ними половой щели. Клитор – это гомолог мужского полового члена, находится в вентральном углу половой щели в виде незначительного возвышения и состоит из двух ножек и тела, оканчивающегося головкой. Преддверие влагалища – это короткая мышечная трубка, начинающаяся от половой щели и заканчивающаяся у отверстия мочеиспускательного канала (табл.6.2.). В подслизистом слое боковых стенок преддверия влагалища заложены парные вестигулярные железы, которые выделяют муциноподобный секрет. Этим секретом увлажняется слизистая оболочка преддверия влагалища в период стадии возбуждения полового цикла и родового акта.

К внутренним половым органам самки относят влагалище, матку, фалло-

пиевы трубы и яичники. Влагалище – это орган совокупления и вывода плода. Оно представляет собой довольно длинную трубку от преддверия до влагалищной части шейки матки, располагается в тазовой полости под прямой кишкой. Слизистая оболочка влагалища покрыта плоским многослойным эпителием, которая образует (за исключением свиней) многочисленные продольные складки и не имеет желез.

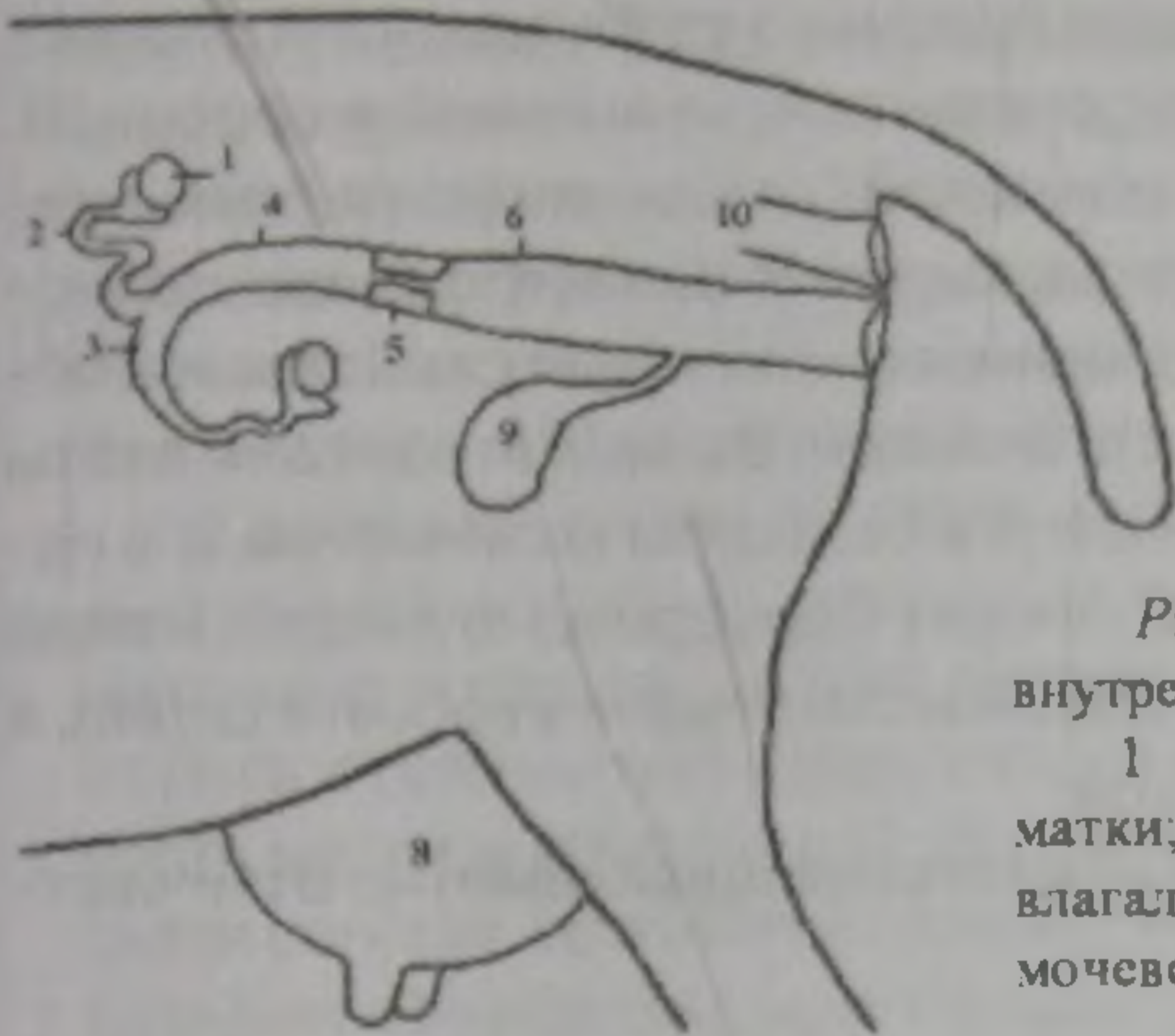


Рисунок 6.2. Упрощенная схема строения внутренних половых органов у самок животных.

1 – яичник; 2 – фаллопиева труба; 3 – рога матки; 4 – тело матки; 5 – шейка матки; 6 – влагалище; 7 – вульва; 8 – молочная железа; 9 – мочевой пузырь; 10 – прямая кишка.

Таблица 6.1. Анатомическая особенность внутреннего полового аппарата самок сельскохозяйственных животных

Орган	Функциональная сущность	Видовая особенность			
		Корова	Овце-матка	Свиноматка	Кобыла
Влагалище	Орган совокупления и вывода плода. (длина, см)	30	12	18	32
Матка	Орган плодоношения: длина шейки матки, см. длина тела матки, см. длина рогов матки, см.	8-12; 2-3; 16-20	5-7; 2-3; 10-15	12-20; 2-3; 100-200	5-7; 10-15; 15-25
Фаллопиева труба	Орган оплодотворения (длина, см.)	20-30	10-15	20-30	20-30
Яичник	Орган образования яйцеклеток и секреции гормонов (форма)	Округлая	Гроздевидная	Бобовидная	Эллипсоидная
	Масса, г	14-20	0,7-3,0	5-9	40-70
	Длина, см	3,5-5	1,4-1,8	2-3,5	5-9
	Ширина, см	2-2,8	1,2-1,7	1,5-2	3-5
	Толщина, см	1,5-2	0,8-1,0	0,9-1,3	2,5-4

Матка является органом плодоношения и состоит из трех отделов: шейки, тела и двух рогов – правого и левого. Шейка является каудальной частью матки, располагается между телом матки и влагалищем. Узкий канал шейки матки открывается только во время стадии полового возбуждения и родового акта. Шейка состоит из трех оболочек: слизистой, мышечной и серозной. Слизистая оболочка покрыта высоким однослойным цилиндрическим эпителием, которая функционирует как железа, выделяя шейечную слизь, содержащую муцины. Эта слизь обладает биологически важными свойствами: абсорбции, бактерицидности и бактериостатичности. Во время половой охоты слизь маловязкая, прозрачная и выделяется в большом количестве, а в период беременности шейечный секрет выполняет барьерную функцию в виде слизистой пробки. Тело матки служит плодовместилищем у кобыл и ослиц, а рога матки – у коров, буйволиц, овец и коз.

По форме рога матки разных видов млекопитающих заметно отличаются друг от друга:

- у коров, овец и коз матка двурогая;
- у лошадей перегородка в теле матки отсутствует;
- у многоплодных животных (свиньи, кошки, собаки, мыши) отсутствует тело матки, а шейка матки переходит непосредственно в рога, благодаря чему увеличивается количество потенциальных мест для имплантации;
- у кроликов матка двойная с двумя самостоятельными шейками, которые независимо открываются во влагалище.

Яйцепроводы (фаллопиевы трубы) – это парные, сильно извитые трубочки. Их функциональная сущность сводится к обеспечению встречи овулировавшей яйцеклетки со сперматозоидом и их оплодотворению. В яйцепроводах различают брюшной конец и маточный. Брюшной конец более широкий и начинается воронкообразным расширением, который переходит в ампулу. Вблизи от рога матки яйцепровод сужается, образуя ампулоистмическое соединение, которое переходит в истмус и далее в маточнотрубное соединение (рис.6.3.). В стенке яйцепровода различают три слоя: слизистый, мышечный и серозный. Слизистая оболочка образует многочисленные складки, покрытые цилиндрическим мерцательным эпителием, реснички которого направляют

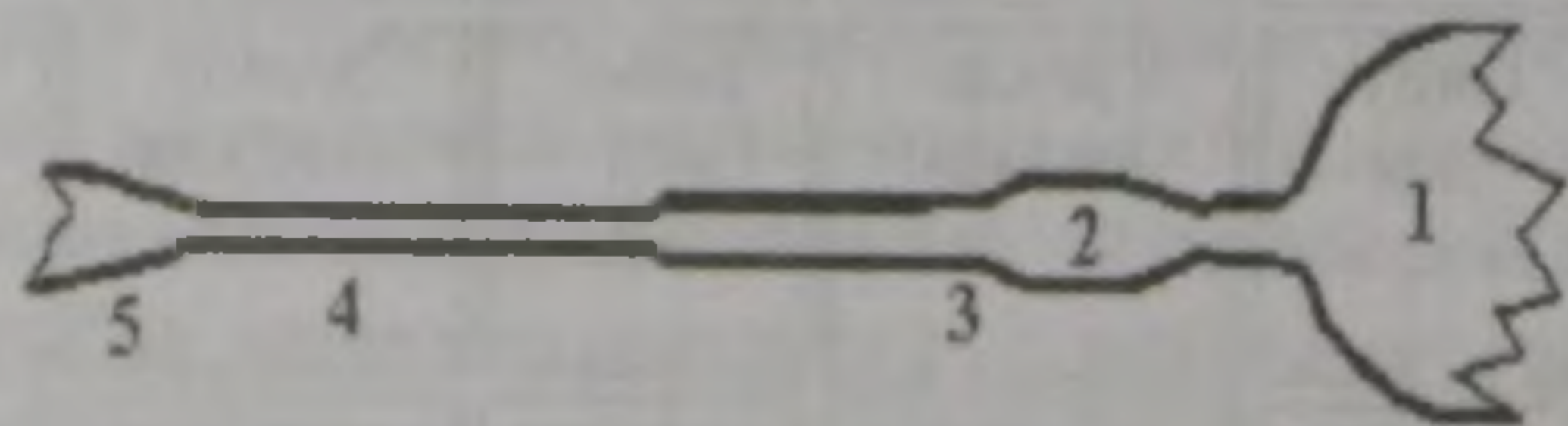


Рисунок 6.3. Схематическое изображение отделов фаллопиевой трубы.

1 – воронка, 2 – ампула, 3 – истмус; 4 – ампуло-истмическое и 5 – маточно-трубчатое соединение.

ток жидкости в сторону матки. Эта оболочка секретирует фермент гиалуронидазу, которая принимает участие в процессе оплодотворения.

Яичники – это небольшие парные органы. Яичники выполняют две функции – производят женские половые клетки (яйцеклетки) и секретируют женские половые

гормоны (эстроген, прогестерон). Зрелые ооциты выделяются с наружной поверхности яичника, при овуляции они попадают на бахрому яйцепровода.

Располагаются яичники в брюшной (кобылы) или в тазовой (коровы, овцы, свиньи) полости. Величина и масса яичников сильно варьирует в зависимости от вида животного. Яичники одеты белочной оболочкой, поверхность которой покрыта зачатковым эпителием. На разрезе яичника видны две зоны: корковая – фолликулярная и мозговая – сосудистая. Корковая зона состоит из нежной соединительной ткани. Этот слой содержит в себе фолликулы и желтые тела. Мозговой слой обильно пронизан сосудами и нервами.

Кровоснабжение половых органов самок осуществляется от семенной внутренней артерии, которая делится на яичниковую ветвь и краниальную маточную артерию (питает передний край маточного рога), среднюю (питает рога и тело матки) и заднюю артерии матки (снабжает кровью каудальную часть матки и влагалище). Из половых органов кровь отводится одноименными венами, которые во время беременности увеличиваются сильнее, чем артерии. Лимфатические сосуды подают лимфу к лимфатическим железам таза и крестца.

Нервы половых органов образуют семенное и тазовое сплетение. Органы совокупления иннервируются еще ветвями крестцового сплетения. Наряду с этим, в матке встречаются нервные центры.

6.2. Репродуктивный аппарат самцов животных

Биологическая сущность полового аппарата самцов заключается в образовании сперматозоидов и создании им благоприятных условий для развития, в выведении их из половых органов и введении в половые органы самок. Половая система самца состоит из семенников, выводных протоков, придаточных половых желез и полового члена.

Семенники – это половые трубчатые железы овальной или округлой формы, расположенные в мошонке и вырабатывающие сперматозоиды и тестостерон (рис.6.4.). Снаружи семенник покрывают две оболочки: серозная (наружная) и белочная (внутренняя). От белочной оболочки отходят соединительно-тканые перегородки, которые образуют около 400 - 500 долек. В каждой дольке 4 - 5 извитых канальцев, длиной от 50 до 80 см. Между канальцами вокруг капилляров расположены интерстициальные клетки, богатые протоплазмой и вырабатывающие мужской половой гормон. Общая длина всех канальцев семенника достигает 1200-6000 м. Извитые канальцы в середине семенника сливаются и впадают в прямые канальцы.

Придаток семенника соединен с задним концом семенника, в нем различают головку, тело и хвост. Головка состоит из 13 - 15 канальцев, которые впадают в сильно извитой канал. Весь канал, составляющий тело придатка семенника, достигает длины 30-80 м.

В хвостовом отделе сперматозоиды дозревают, покрываются защитной липоидной оболочкой и переходят в состояние анабиоза; канал хвоста придатка семенника, сильно расширяясь, переходит в спермиопровод.

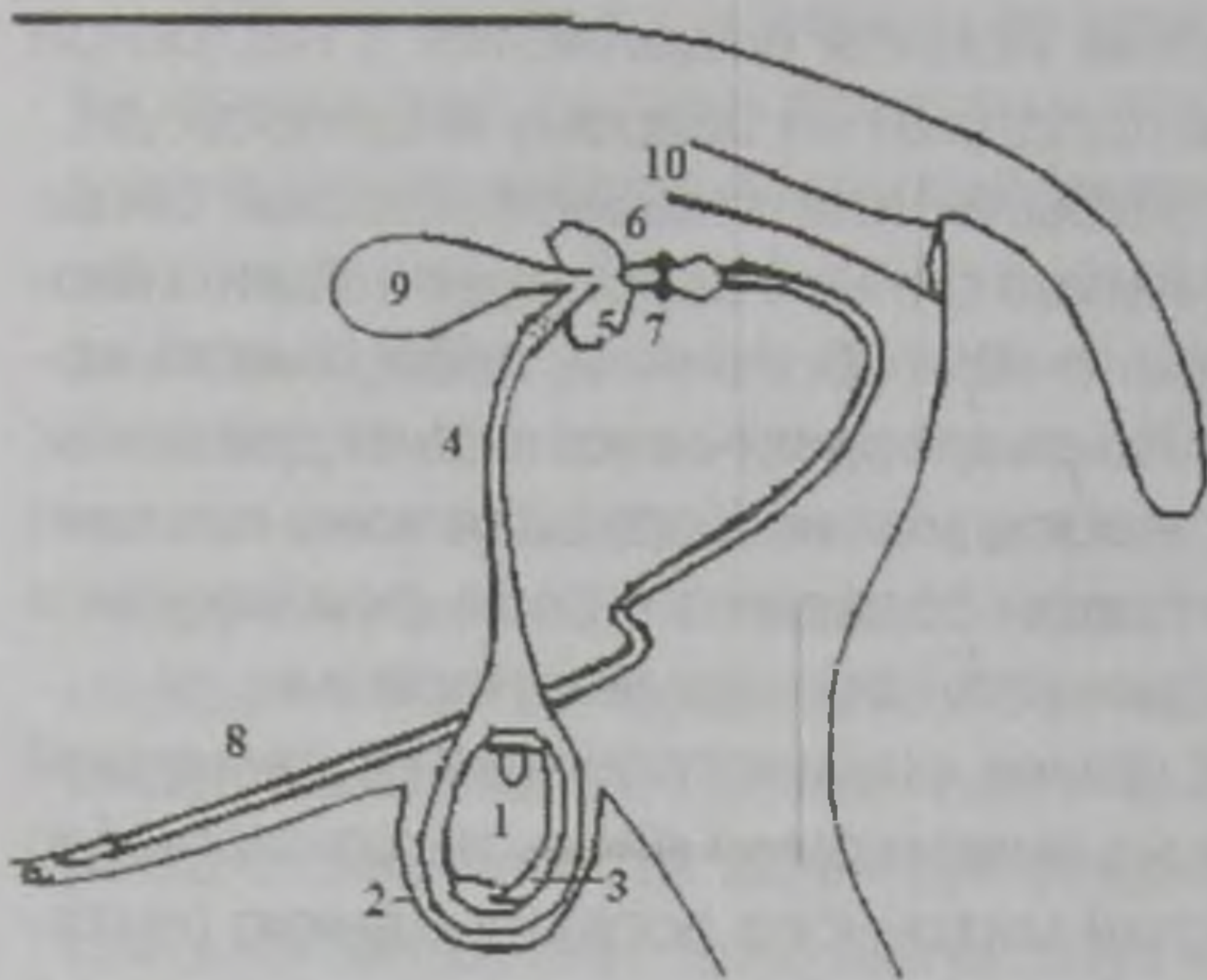


Рисунок 6.4. Упрощенная схема строения половых органов самцов животных: 1 – семенники; 2 – мошонка; 3 – придаток семенника; 4 – спермиопровод; 5 – пузырьковидные железы; 6 – предстательная железа; 7 – луковичная железа; 8 – половой член (пенис); 9 – мочевой пузырь; 10 – прямая кишка.

Семенной канатик состоит из спермиопровода, кровеносных сосудов, нервов и мышечных волокон. Спермиопровод – это длинная трубка с многочисленными складками. В стенках спермиопроводов имеются обильно разветвленные железы (у хряка отсутствуют), выделяющие жидкий секрет, который смешивается со сперматозоидами во время эякуляции. Оба спермиопровода сливаются над шейкой мочевого пузыря в общий небольшой выводной проток, впадающий в начальную часть мочеиспускательного канала (мочеполовой канал), который, в свою очередь, оканчивается на головке полового члена маленьким отверстием.

В мочеполовой канал впадают протоки придаточных половых желез (пузырьковидные, предстательная и куперовы), которые необходимы для разжижения густой массы

сперматозоидов и активизирования их движения. Во время полового акта эякулят поступает в гениталии самок через половой член, который является

у самцов органом совокупления.

Кровоснабжение половых органов самцов осуществляется наружной (мошонка), внутренней (семенник) семенными артериями и внутренней срамной артерией (половой член).

Иннервация осуществляется ветвями срамного (мошонка, половой член), наружного семенного, медиальными подвздошно-подчревного и подвздошно-пахового нервов (мошонка) и ветвями, отходящими от семенного сплетения (семенник).

6.3. ФИЗИОЛОГИЯ ПОЛОВОЙ СИСТЕМЫ САМОК

Как известно, потомство животных рождается с недоразвитыми половыми органами и способность к размножению проявляется лишь в определенном воз-

Таблица 6.2. Сроки полового и физиологического созревания для сельскохозяйственных животных

Зрелость, мес.	Вид животного			
	крупный рогатый скот	овцы	свиньи	лошади
Половая	7,5	7	6	16
Физиологическая	17	14	10	36

расте, с наступлением полового созревания. Животные становятся половозрелыми, когда самец способен оплодотворить самку, а самка – забеременеть. Но используют животных для репродуктивного процесса в период физиологического созревания, когда организм приобретает формы, свойственные взрослому животному данного пола и достигает 70 - 75% его живой массы (табл.6.2.).

Таблица 6.3. Продолжительность полового цикла у животных разных видов

Вид животного	Продолжительность			Время овуляции относительно начало охоты, час
	Цикла, в днях	Течки, в днях	Охоты, в часах	
Корова	20-21	2-4	12-24	10-12 после окончания
Овцематка	16-17	2-3	24-36	24-36 после начала
Свиноматка	20-22	2-3	48-72	36-40 после начала
Кобыла	21-27	5-8	72-144	24-36 до окончания

При физиологическом созревании у самок стабилизируются циклические проявления половой функции.

Половой цикл – это результат ритмической смены функционального состояния яичников и соответствующих изменений гормонального баланса. При этом происходят циклические изменения половой сферы и поведения животных.

Рассматривая поведение самок в половом цикле, различают три стадии: возбуждение, торможение и уравнивание.

При возбуждении проявляются четыре феномена:

Таблица 6.5. Соотношение фаз полового цикла у животных разных видов

Продолжительность фазы, дни	Вид животного			
	корова	овцематка	свиноматка	кобыла
Фолликулярная	3-4	2-3	5-6	7-8
Лютеальная	17-18	14-15	15-16	14-15

- 1) течка – процесс сильной гиперемии половых органов, набухания слизистой оболочки и усиленного функционирования желез преддверия, шейки матки и труб, что сопровождается выделением слизи из половых органов;
- 2) половое возбуждение – самка проявляет «интерес» к самцу;
- 3) охота – положительная сексуальная реакция самки на самца;
- 4) овуляция – процесс выхода ооцита из созревшего фолликула.

У самок первый день охоты обозначают как нулевой день (день "0"), следовательно, овуляция, как правило, наступает в первый день полового цикла (табл.6.4.).

Стадия торможения характеризуется обратным развитием морфологических и физиологических процессов, возникших в стадии возбуждения.

А стадия уравнивания – это относительный покой в поведении самки, но не в ее половом аппарате.

Таблица 6.6. Основные гормоны репродукции		
Железа	Гормон	Биологическая сущность
Передняя доля гипофиза	ФСГ	Стимулирует сперматогенез у самцов, оогенез и фолликулогенез – у самок
	ЛГ	Стимулирует секрецию тестостерона у самцов, эстрогена и прогестерона у самок. Кроме того, обеспечивает овуляцию и поддерживает функцию желтого тела
	Пролактин	Стимулирует образование и секрецию молока
Задняя доля гипофиза (является только хранилищем, секретирует гипоталамус)	Окситоцин	Активизирует выведение молока молочной железой и обеспечивает сокращение матки при родах
Яичник (фолликул)	Эстроген	Развитие вторичных половых признаков самки, регуляция полового цикла. При беременности – предохраняет матку от инфекций, подавляет выделение ФСГ, стимулирует рост молочных желез, увеличивает размеры мышечных клеток матки
Яичник (желтое тело)	Прогестерон	Поддержание беременности, подавление овуляции и сокращения миометрия, стимулирует рост молочных желез
Плацента	Хорионический гонадотропин	Поддержание фазы желтого тела беременности
	Плацентарный лактоген	Стимулирует рост молочных желез
Семенник	Тестостерон	Развитие вторичных половых признаков самца

Кроме того, половой цикл в зависимости от гормонального статуса условно делят на фолликулярную и лютеальную фазы (табл. 6.5.).

В фолликулярной фазе различают две стадии: предовуляционную, которая предшествует выделению яйцеклетки и постовуляционную, продолжающуюся от момента овуляции до формирования желтого тела. Фолликулярная фаза сопровождается усиленным выделением гормона ФСГ, который необходим для роста и развития доминирующего фолликула. При лютеальной фазе внешние проявления половой активности исчезают, и организм подготавливается к беременности. Эта фаза сопровождается сначала выделением гормона ЛГ, который необходим для овуляции, а затем усиленным выделением прогестерона (при наступлении беременности) или переходу к новому циклу (в случае, когда оплодотворения не происходит).

Взаимосвязь гипоталамус – гипофиз – яичник. Координация функции нервной и эндокринной систем находится под влиянием гипоталамуса, оказывающего влияние на переднюю долю гипофиза – аденогипофиз посредством нейросекреции специализированных групп клеток гипофизотрофической области.

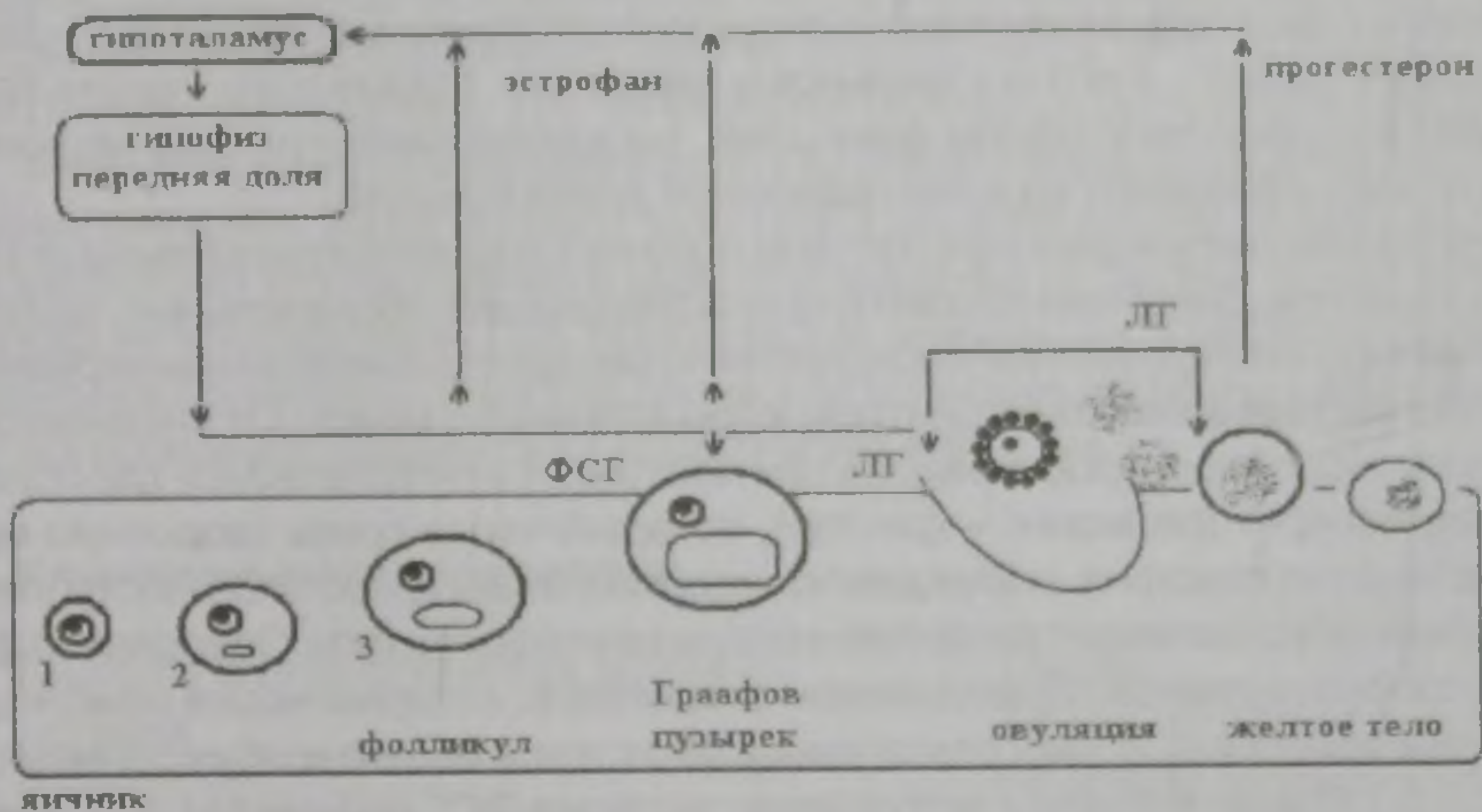


Рисунок 6.5. Схема гормональной регуляции репродуктивного процесса в организме животных.

1 – первичный фолликул, 2 – вторичный фолликул, 3 – третичный фолликул.

Аденогипофиз не содержит нервных волокон и терминалей и поэтому связь с головным мозгом осуществляется посредством сосудистого звена – гипоталамо – гипофизарной воротной системы.

В аденогипофизе содержатся клетки различных типов, эти клетки идентифицируются по своим размерам, форме и гистологическим свойствам. ЛГ и ФСГ синтезируются в клетках, названных гонадотрофами. Клетки другого типа, играющие важную роль в процессах размножения – лактотрофы, секретируют пролактин.

ЛГ и ФСГ – это гликопротеины, состоящие из двух пептидных цепей – α – и в β – субъединиц: α – цепи ЛГ и ФСГ практически идентичны, а β – цепи различны, что и обеспечивают биологическую специфичность их эффектов. Для

осуществления активности необходимы как α – , так и β – цепи. Пролактин образован одной пептидной цепью. Секреция ЛГ и ФСГ находятся под стимулирующим влиянием гонадотропин – рилизинг фактора (ГРФ), тогда как секреция пролактина находится под ингибирующим контролем пролактин – ингибирующего фактора (ПИФ). ФСГ вызывает рост и созревание фолликулов в яичниках. Под действием ЛГ (при оптимальном соотношении ФСГ и ЛГ примерно 1:10) происходит овуляция и формирование желтого тела и, кроме того, этот гормон стимулирует функцию молочной железы во время лактации. Необходимо отметить еще об одном гормоне, который вырабатывается гипоталамусом, но резервуаром для него служит задняя доля гипофиза, это *окситоцин*, необходимый для стимуляции активного выведения молока молочной железой и сокращения матки при родах.

Гонадальные гормоны вырабатываются в яичниках. К ним относятся фолликулярный гормон – эстроген (эстрон, эстрадиол и эстриол) и гормон желтого тела – прогестерон. Из эстрогенов наиболее активным является эстрадиол, а две другие представляют собой продукты его превращений. Кроме того, эстрогены образуются также плацентой. Благодаря эстрогенам, гипофиз увеличивает выделение либо ФСГ, либо ЛГ (табл.6.6.).

Прогестерон подготавливает слизистую оболочку матки к имплантации зародыша и далее – к его нормальному развитию. Кроме того, прогестерон обладает антифолликулярной функцией, вызывает гипертрофию молочных желез и подготавливает их к лактационной деятельности.

Вся указанная гуморальная система получает первичные импульсы от коры головного мозга. Динамика полового цикла следующая: обонятельные, зрительные, слуховые и осязательные восприятия по центростремительным нервам передаются воспринимающим центром коры головного мозга. От анализаторов коры импульсы по центробежным путям поступают к гипоталамусу, где образуется нейросекрет (релизинг – фактор), который через кровь (воротную вену) воздействует на гипофиз, побуждая последний к выделению ФСГ. Поступление ФСГ в кровь обуславливает развитие и созревание фолликула. Созревание фолликула сопровождается образованием эстрогенов, которые через хеморецепторы и анализаторы головного мозга вызывают течку, общее возбуждение и охоту (рис.6.5.). С возрастанием эстрогенов секреция ФСГ снижается, а ЛГ увеличивается, что ведет к овуляции, а затем к образованию желтого тела.

Если беременность не наступает, то концентрация прогестерона постепенно снижается до минимума, при этом происходит активация лютеотропной функции гипофиза (секреция ФСГ), в результате чего происходит рост новых фолликулов и половой цикл повторяется.

Резюме

К репродуктивной системе животных относят гениталии и железы, которые в комплексе обеспечивают у животных процесс размножения (рис.6.6.). Железы вырабатывают гормоны, необходимые для регулирования воспроизводительных качеств, гонады выполняют двойную функцию, так как могут вырабатывать гормоны и образовывать гаметы, которые нужны для зарождения нового индивида. Половые органы создают благоприятные условия для процессов оплодотворе-

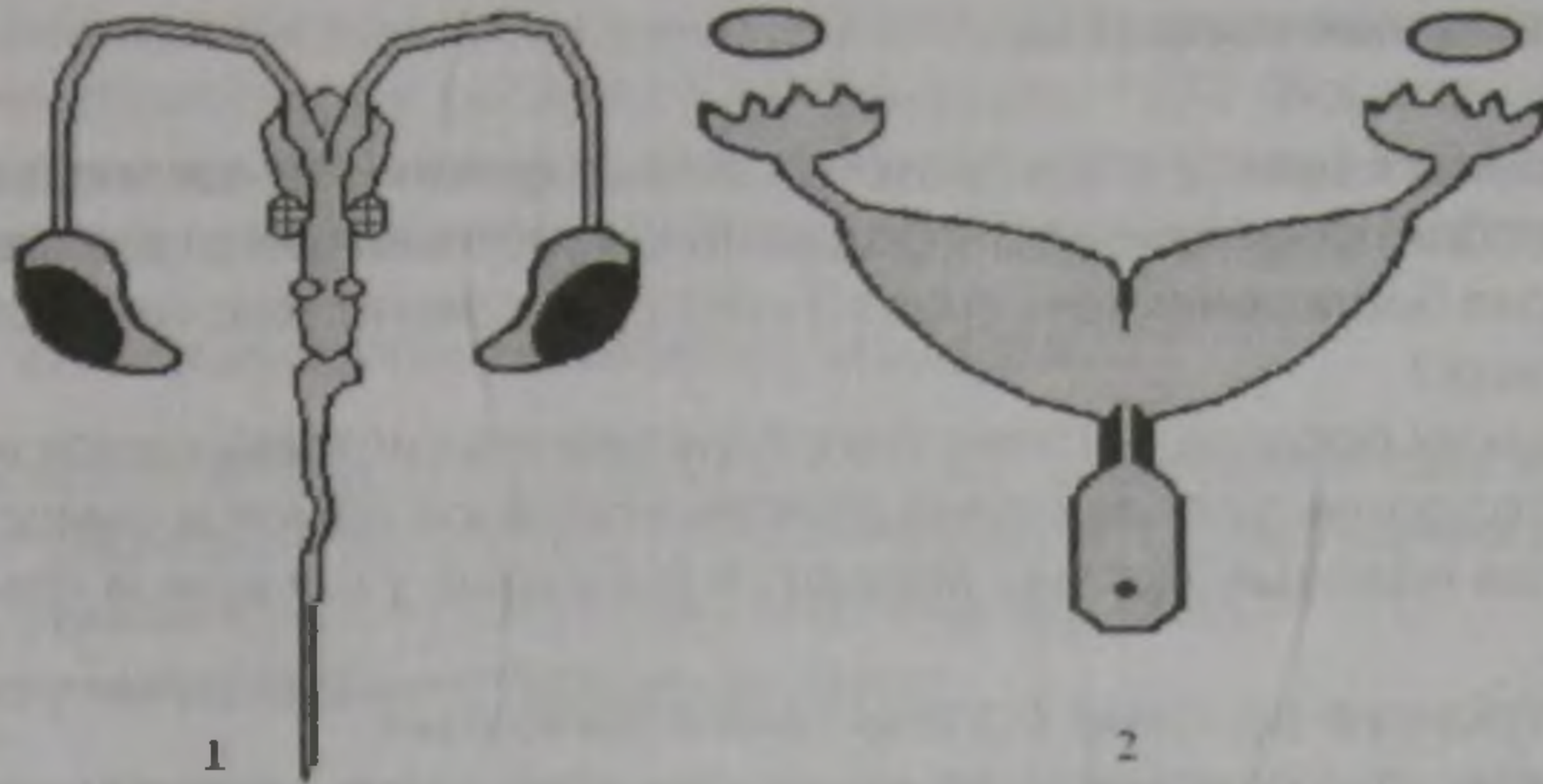


Рисунок 6.6. Упрощенная схема строения половых органов самца и самки сельскохозяйственных животных на примере овец.

ния гамет, развития плода, рождения и кормления в молочный период их развития. При этом роль самки в процессе размножения велика и она сопряжена с взаимодействиями между гипоталамусом, гипофизом, яичниками, маткой и плодом. Внутреннее оплодотворение составляет важную часть репродуктивного цикла млекопитающих животных, оно облегчается благодаря органам совокупления.

Знание биологии размножения животных имеет большое теоретическое и прикладное значение. Теоретическое значение определяется тем, что раскрытие закономерностей возникновения и развития животных позволяет глубже понимать природу их наследственности. Практическая значимость определяется тем, что правильное понимание сущности процессов репродукции способствует управлению воспроизводительных свойств организма животных.

Ключевые слова и понятия:

Биологическая сущность половых органов

Влагалище

Возбуждение

Гипоталамус

Гипофиз

Гормоны гипофиза: ФСГ, ЛГ, пролактин

Гормоны гонад: тестостерон, прогестерон,

эстроген

Зрелость: половая, физиологическая

Каналы: вольфовы, мюллеровы

Матка: шейка, тело, рога

Овуляция

Охота

Половой цикл

Половые железы

Половые валики

Придаток семенника

Репродуктивная система животных

Репродуктивные органы животных

Рилизинг - фактор

Семенник

Семенной канатик

Течка

Торможение

Фаллопиевы трубы

Яичник

Контрольные вопросы:

1. Из каких каналов образуются половые органы самок и самцов?
2. Что собой представляет репродуктивная система и репродуктивный орган?
3. Какова биологическая сущность репродуктивной системы самок и самцов животных?
4. Из каких органов состоит репродуктивная система самок и самцов?
5. Гистологическое строение половых органов самок и самцов.
6. Какие половые органы являются парными у самцов и самок животных?
7. Внутренние половые органы самок животных.
8. Яичник: функциональная сущность, строение, иннервация и кровоснабжение.
9. Фаллопиевы трубы: функциональная сущность, строение, иннервация и кровоснабжение.
10. Матка: функциональная сущность, строение, иннервация и кровоснабжение.
11. Влагалище: функциональная сущность, строение, иннервация и кровоснабжение.
12. Особенности строения рогов маток у разных видов животных.
13. Семенник: функциональная сущность, строение, иннервация и кровоснабжение.
14. Выводные протоки: функциональная сущность, строение, иннервация и кровоснабжение.
15. Придаточные половые железы: функциональная сущность, строение, иннервация и кровоснабжение.
16. Физиология половой системы самок животных.
17. Созревание: половое и физиологическое.
18. Сроки созревания у разных видов сельскохозяйственных животных.
19. Половой цикл: стадии и продолжительность у разных видов самок животных.
20. Феномены возбуждения.
21. Фазы половых циклов в зависимости от гормонального статуса организма.
22. Взаимосвязь гипоталамус – гипофиз - яичник.
23. Гормоны репродукции.
24. Гормоны гипофиза.
25. Гормоны гонад: яичника и семенника.
26. Какие гормоны репродукции, на Ваш взгляд, занимают доминирующую позицию в регулировании воспроизводительных качеств животных?
27. Раскрыть биохимическую сущность гормонов репродукции животных.

Рекомендуемая литература. Очень подробно рассматриваются вопросы, касающиеся репродуктивного аппарата животных в учебниках по ветеринарному акушерству и гинекологии (А.П.Студенцов, 1980; В.С.Шипилов, 1988), биологии (Н.Грин, 1990, т.3) и физиологии сельскохозяйственных животных (Георгиевский В.И., 1990; Несипбаев Т.Н., 2000).

При изучении органов размножения в зависимости от видовой принадлежности советую обратиться к работам Т.А. Мингазова, 1988 (Воспроизведение сельскохозяйственных животных), Ruth M. Gatenby, 1991 (Sheep), R. B. Land, 1999 (Genetics variation in hormone system), P. R. Wilson, 1999 (Biology of Reproduction).

Глава 7. Отбор животных и подбор матерей

Цель: Освоить метод отбора самцов – производителей, самок – доноров и самок - реципиентов для биотехнологических исследований в животноводстве. Ознакомиться с правилами подбора матерей.

После изучения главы студент сможет:

- дать разъяснение требованиям, которые предъявляются для отбора животных в зависимости от их назначения;
- произвести отбор производителей, доноров и реципиентов;
- охарактеризовать критерии отбора и подбора матерей;
- произвести подбор матерей;
- охарактеризовать продуктивные особенности производителей, доноров и реципиентов с использованием методов количественной биологии.

Таблица 7.1. Схема работ при постановке опыта по биотехнологии животных

№	Этап работы	Применяемая методика
1	2	3
1	Отбор животных	Производителя и донора отбирают из племенного ядра, реципиента – из пользовательного стада
2	Подбор животных	При подборе родителей (производитель и донор) применяют заказное спаривание, при подборе матерей (донор и реципиенты) – метод синхронизации охоты
3	Суперовуляция доноров	Методики, применяемые для вызывания полиовуляции, зависят от видовой принадлежности и используемых препаратов. Суперовулированный фолликулогенез обеспечивается экзогормонами.
4	Осеменение доноров	Естественная случка или искусственное осеменение
5	Вымывание эмбрионов	После убоя, хирургический, нехирургический методы
6	Эмбриокультуральные исследования	Селекция и отбор гамет и эмбрионов, культивирование гамет и эмбрионов, экстракорпоральное оплодотворение, криоконсервация гамет и эмбрионов

1	2	3
7	Молекулярно-клеточные технологии	Трансгенез, клонирование, создание химер с дальнейшей эмбриональной "реанимацией"
8	Пересадка эмбрионов	Хирургический, нехирургический методы
9	Рождение трансплантатов	Изучение роста и развития
10	Отбор трансплантатов для воспроизводства	Этапы работ с 1 по 9 повторяются

При постановке опыта по биотехнологии в животноводстве исследователю необходимо иметь четкое представление об основных этапах работы с определением основной цели и конкретных задач.

В целом, работа по биотехнологии в животноводстве складывается из этапов, представленных в таблице 7.1.

7.1. Отбор самцов-производителей и самок-доноров

Как видно из таблицы 7.1. при работе по биотехнологии начальным этапам является отбор самцов - производителей и самок - доноров из племенного ядра. В задачу этого учебника не входит рассмотрение вопросов, касающихся отбора животных в племенное ядро. Здесь мы ознакомимся только с правилами отбора животных при работах по биотехнологии в животноводстве.

Требования, предъявляемые к донорам и производителям в животноводстве высоки, так как именно от них методами биотехнологии получают высокоценные по генотипу эмбрионы. Использование таких эмбрионов в животноводстве имеет большое значение, так как клеточное манипулирование *in vitro* способствует:

- 1) при экстракорпоральном оплодотворении – получению животных с заданным полом;
- 2) при биокопировании – получению клонированных животных;
- 3) при трансгенезе – получению животных, отличающихся не свойственными биохимическими и зоотехническими параметрами;
- 4) при трансплантации – ускоренному размножению ценных генотипов животных;
- 5) при криоконсервации – созданию банка гамет и эмбрионов;
- 6) при экспорте и импорте животных – обмену на уровне гамет и эмбрионов.

Перечисленные преимущества подтверждают значимость первого этапа работы – этапа отбора доноров и производителей. Поэтому основными критериями для отбора являются биологические (вид, порода, возраст), физиологические (состояние здоровья, воспроизводительные качества) и зоотехнические (продуктивность) особенности животных.

Следовательно, конкурентоспособная репродукция животных методами биотехнологии возможна в том случае, когда отбираемые самцы-производители и самки - доноры обладают следующими особенностями:

1. Имеют ценный генотип, проверенны по качеству потомства и по зоотехническим требованиям относятся к классу элита и элита - рекорд.

2. Имеют отличное физиологическое здоровье, высокую резистентность к инфекционным заболеваниям и высокие воспроизводительные качества.
3. Принадлежат одной породе (чистопородное разведение).
4. Физиологически зрелые.

7.2. Отбор реципиентов.

Подбор матерей: мать–донор и мать–реципиент

При использовании методов биотехнологии воспроизводства для трансплантируемого эмбриона различают биологическую (самка - донор) и физиологическую (самка - реципиент) мать. Самки - доноры в животноводстве необходимы для получения генетически ценных эмбрионов, а самки - реципиенты – для создания пересаживаемым эмбрионам физиологических, иммунологических и биохимических факторов роста и развития (реципиент, как естественный инкубатор). Использование реципиентов в животноводстве (суррогатной матери в медицине) можно объяснить тем, что, к сожалению, наши знания в области культивирования еще настолько малы, что мы не можем обеспечить инкубацию эмбриона, а в дальнейшем, и плода в условиях *in vitro*. Но это реально, так как с углублением и расширением наших знаний в области биохимических и физиологических преобразований, происходящих в совокупности в эмбрионе и в организме матери, мы сможем обеспечить рост и развитие эмбриона, а далее и плода в питательной среде.

Но на сегодня, отбор реципиентов остается актуальным и поэтому, здесь уделяется особое внимание этому вопросу, так как от правильного отбора и подбора матерей зависит результат всей работы по биотехнологии воспроизводства животных.

Отбор самок - реципиентов осуществляют в три этапа: на первом этапе подготавливают всех физиологически зрелых самок из пользовательного стада, на втором этапе отбирают самок, у которых период эструса (охоты) проявляется синхронно с эструсом (охоты) самки - донора, на третьем этапе необходимое число реципиентов определяется числом полученных при вымывании у донора биологически полноценных эмбрионов. Данный трехэтапный отбор способствует обеспечению физиологической синхронности между самками-донорами, эмбрионами и самками -реципиентами при трансплантации (табл.7.2; рис.7.1.).

Таблица 7.2. Отбор самок-реципиентов

Этап	Фактор, влияющий на отбор	Особенность этапа	Из расчета на донора
1	Зоотехнические требования	Второсортные, физиологически зрелые самки, имеющие хорошие воспроизводительные качества	30-50
2	Половой цикл	Подобранные к донору реципиенты имеют с ней синхронное проявление охоты	5-10

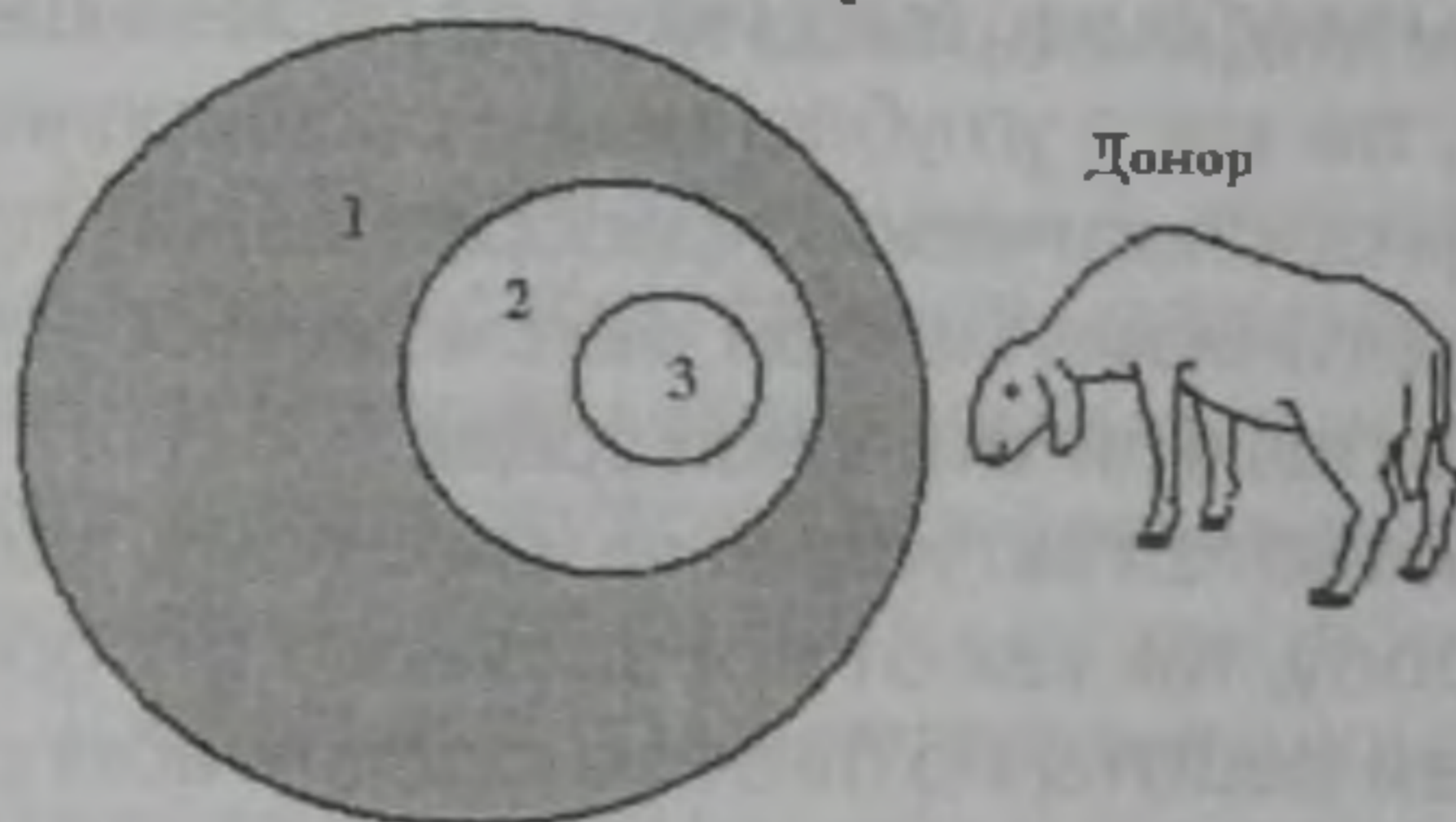
1	2	3	4
3	Число эмбрионов	Пересаживают биологически эмбрионы (из расчета 2 эмбриона на одно "посадочное" место матки)	только полноценные эмбрионы 3-5

Этап I. Отбор реципиентов из пользовательного стада.

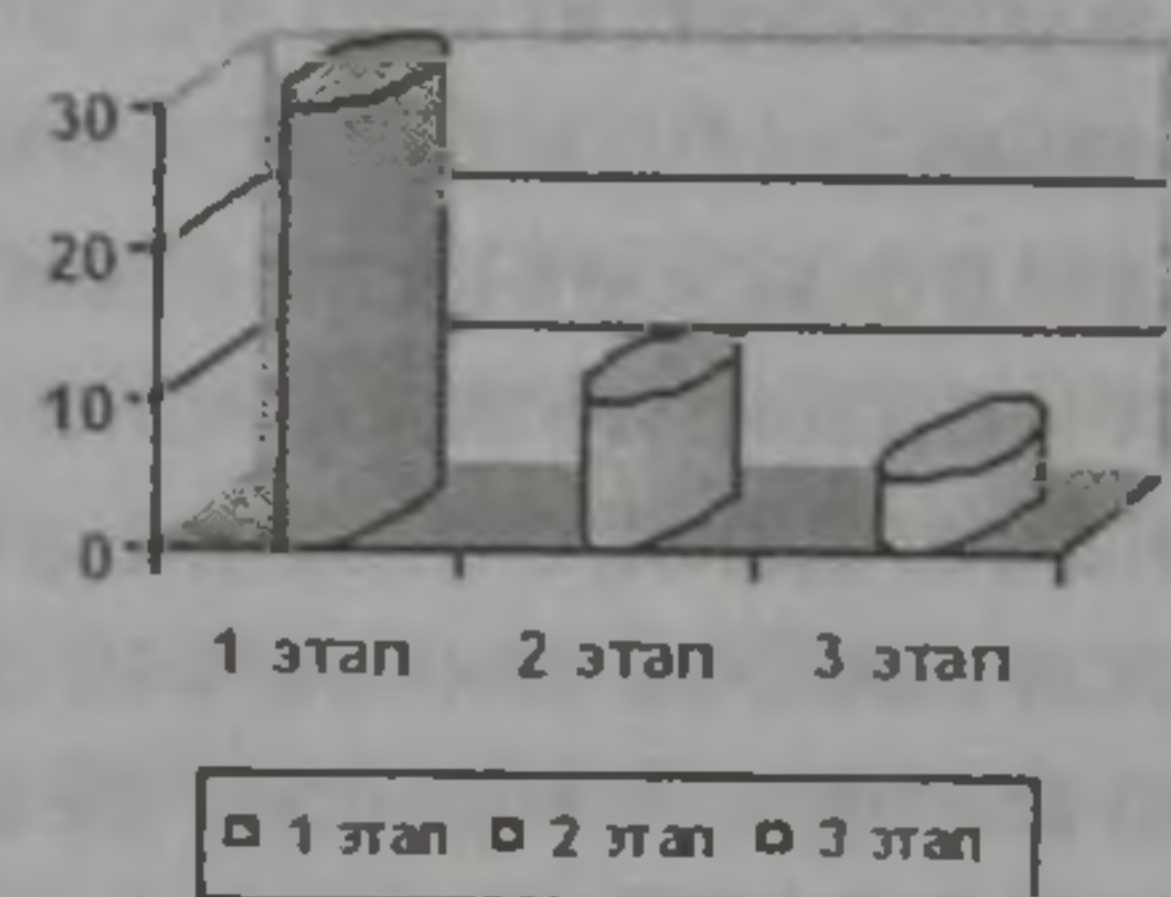
На этом этапе *требования*, предъявляемые к реципиентам следующие:

По зоотехническим требованиям – второсортные, т.к. имеют средние или низкие показатели продуктивности. Отнесение реципиентов ко второму классу обязательно потому, что в животноводстве методы трансплантации эмбрионов применяют, прежде всего, для того, чтобы за короткий период времени от не высокопродуктивных самок получить как можно больше генетически высокоценный приплод. Такая методика способствует ускоренному размножению высокопродуктивных животных.

Реципиенты: этапы отбора.



Этапы отбора реципиентов



а) подбор матерей – мать - донор и матери-реципиенты; 1 – самки - реципиенты из пользовательного стада (на донора подготавливают 30 - 50 гол.); 2 – реципиенты, имеющие синхронную с донорами охоту (на донора подготавливают 5 – 10 гол.); 3 – реципиенты с пересаженными эмбрионами (на донора подготавливают 3 - 5 гол.).

б) поэтапный отбор реципиентов (показатели усреднены): на первом этапе на отбор влияют зоотехнические требования; на втором – синхронность проявления охоты; на третьем – число полученных эмбрионов.

Рисунок 7.1. Овцематка-реципиент – как физиологическая мать (реципиент – естественный “инкубатор”).

1. По состоянию здоровья – физиологически здоровые, с хорошей резистентностью и хорошими воспроизводительными качествами.

2. По возрасту – физиологически зрелые самки.

3. Породная принадлежность для самок-реципиентов не имеет значения, так как обычно в животноводстве целесообразно применять межпородную пересадку. Благодаря такой пересадке изучается влияние материнского эффекта на рост, развитие и формирование продуктивных качеств у трансплантата.

Как видим из перечисленных требований, на первом этапе отбора потенциальными претендентами на роль реципиентов являются все физиологически зрелые самки, входящие в состав пользовательного стада. Следовательно, на первом этапе на одного донора, в среднем, подготавливают 30 - 50 реципиентов. Поэтому на этом этапе необходимо опираться

на биологические (возраст) и зоотехнические (второсортные самки) показатели.

Особенностью этого этапа является то, что до использования по назначению самки-реципиенты (в том числе производители и доноры) за 1,5 – 2 месяца до эксперимента получают с кормом различные пищевые, минеральные добавки и витамины (Е). Это мероприятие необходимо для того, чтобы обеспечить успешную работу по ускоренному размножению ценных генотипов животных.

Этап II. Отбор самок - реципиентов в зависимости от проявления охоты полового цикла.

На этом этапе при отборе реципиентов необходимо опираться на физиологические особенности самок - доноров животных. Данный этап характеризуется подбором матерей - реципиентов к матерям - донорам, что определяется синхронностью между их половыми циклами. Следовательно, синхронность в проявлении охоты половых циклов между донорами и отбираемыми реципиентами – это важное условие подбора матерей. Поэтому необходимо соблюдать правила подбора матерей (мать – донор и матери – реципиенты):

1. Должна соблюдаться синхронность между половыми циклами донора и подготовленных к ним реципиентов. Для определения самок в охоте применяют самцов - пробников, которые выявляют самок в охоте по рефлексу неподвижности.

При подготовке матерей можно воспользоваться двумя способами, первый из которых заключается в том, что реципиенты подбираются с естественными циклами (методика приемлема в овцеводстве), а второй – в использовании гормональных препаратов с целью обеспечения синхронности в проявлении охоты между донорами и реципиентами (метод синхронизации охоты; применяют в скотоводстве).

2. На самку – донор подготавливают 5–7(10) реципиентов. При подготовке реципиентов необходимо учитывать видовую и породную принадлежность самок животных.

Как видим, на втором этапе на роль реципиентов допускаются лишь те самки, у которых наблюдается синхронность в проявлении охоты между половыми циклами самки - донора и самками пользовательного стада. При этом реципиенты отбираются от того поголовья самок, которые были уже подготовлены на первом этапе.

Этап III. Отбор реципиентов в зависимости от числа извлеченных биологически полноценных эмбрионов.

Это заключительный этап отбора, при котором число подготавливаемых реципиентов зависит от числа полученных биологически полноценных эмбрионов. На этом этапе на отбор самок - реципиентов оказывает влияние физиологическая взаимосвязь между реципиентом и эмбрионом (следовательно, между донором и реципиентом). Данная связь характеризуется: 1) стадией развития желтого тела; 2) стадией развития матки и 3) стадией развития эмбриона. Более подробно этот вопрос будет рассмотрен в главах 9.3. - 9.4.

Из всего вышеизложенного можно заключить, что основными критериями отбора для матерей являются: биологические (возраст), зоотехнические (продуктивность) особенности животных и физиологические показатели (половой цикл), а основным критерием для подбора – физиологический пока-

затель (синхронность между половыми циклами доноров и реципиентов или синхронность между стадиями развития желтого тела, матки и эмбриона).

Кроме того, необходимо обратить внимание на следующую закономерность: в процессе отбора число претендентов на роль реципиентов резко снижается при переходе из одного в другой этап. Так, на первом этапе отбора число подготавливаемых реципиентов из расчета на донора составляет, в среднем, 30 - 50, на втором – 5 - 7 (10), а на третьем – уже 3 - 5 (7).

7.3. Методы количественной биологии в биотехнологии

Применение популяционно-статистического метода при анализе массовых данных в области биологии называют количественной биологией. Предметом данной науки служит любой биологический объект, изучаемый с количественной стороны в целях оценки его качественного состояния. Современная генетика, селекция и биотехнология сельскохозяйственных животных широко использует методы количественной биологии при генетическом анализе различных популяций (пород, стад, линий, семейств, клеток). Благодаря методам количественной биологии выявляют долю генетической и паратипической изменчивости в общей фенотипической изменчивости признака.

Изучение методов количественной биологии необходимо биотехнологу для того, чтобы он смог использовать методы статистического анализа для раскрытия диалектики связи между частью и целым, причиной и следствием, случайным и необходимым в явлениях живой природы.

В этой связи, для изучения статистического анализа в биотехнологии в практикуме по биотехнологии животных приводится одна глобальная задача, для раскрытия которой студент изучает десять тем (см. Практикум по биотехнологии животных; часть 3).

Резюме

Решение типовых задач поможет студенту освоить методику проведения селекционного анализа в биотехнологии. Не следует забывать, что в животноводстве методы биотехнологии нужны, прежде всего, для того, чтобы получить скороспелых животных, обладающих ценным генотипом. Поэтому перед постановкой эксперимента, нужно помнить, что результат работы зависит именно от начального этапа – отбора производителей, доноров и реципиентов. При этом основными критериями отбора являются: 1) биологические особенности животных (вид, порода, возраст); 2) физиологическое состояние (здоровье, половой цикл); 3) зоотехнические требования (высокая продуктивность для доноров и производителей, средняя и низкая продуктивность для реципиентов).

При подборе матерей необходимо учитывать физиологический критерий (синхронность проявления охоты). Поэтому при подборе матерей (донор, как биологическая мать и реципиенты, как физиологические матери) необходимо соблюдать физиологическое состояние самок, так как важным условием успешной трансплантации эмбрионов является синхронность между половыми циклами донора и подобранных (или подготовленных) к ним реципиентов. Только в этом случае возможен "удачный диалог" между биологической матерью (донор), пересаживаемым эмбрионом и физиологической матерью (реципиент), который должен завершиться рождением трансплантата.

Ключевые слова и понятия:

Возраст животного	Подбор матерей: мать - донор и мать - реципиент
Государственная племенная книга	Продуктивность животных
Зоотехническое требование	Происхождение животных
Качество потомства	Стандарт породы
Межпородная пересадка	Требования, предъявляемые к отобранному животному
Минимальные показатели	Чистопородное разведение
Отбор производителей	Этапы отбора самок-реципиентов
Отбор самок - доноров	
Отбор самок - реципиентов	

Контрольные вопросы:

1. Что понимают под термином "отбор"?
2. Самец - производитель и самец пробник: особенности их использования.
3. Самка - донор и самка - реципиент: особенности их использования.
4. Какая категория животных принимает активное участие в воспроизводстве стада?
5. Какие требования необходимо соблюдать для отбора производителей и доноров?
6. Какие требования необходимо соблюдать для отбора реципиентов?
7. Сколько этапов нужно пройти для того, чтобы подготовить нужное количество реципиентов?
8. Сколько реципиентов подготавливают на одного донора на первом, втором и третьем этапах?
9. Как выявляют охоту у самок - доноров и самок - реципиентов?
10. Какое важное условие необходимо учитывать при подборе матерей?

Рекомендуемая литература. Более подробную информацию студент получит, обратившись к учебникам по разведению и селекции животных, племенному делу, где очень подробно изложены принципы оценки и отбора животных по происхождению, конституции, экстерьеру, продуктивности и качеству потомства: В.Ф.Красота и др. Разведение сельскохозяйственных животных, Москва, 1990; В.Л.Петухов и др. Генетические основы селекции животных, Москва, 1989; Л.К.Эрнст и др. Племенное дело в животноводстве, Москва, 1987; Г.Л.Ким Практикум по селекции и разведению животных, Алматы, 2000; Г.Л.Ким Практикум по животноводству, 2002. Также рекомендую обратиться к научным изданиям, таким как, вестник сельскохозяйственной науки, животноводство и др. Кроме того, можете ознакомиться с работой G.Wiener. Animal Breeding, 2001. Для изучения вопросов, касающихся методов количественной биологии рекомендую обратиться к учебникам по биометрии (Е.К.Меркурьева, 1970; Г.Ф.Лакин, 1990; Г.А. Джамалова и др., 2003).

Глава 8. Суперовуляция и осеменение самок-доноров

Цель: Ознакомиться с методами вызывания суперовуляции и синхронизации охоты. Изучить метод осеменения.

После изучения главы студент сможет:

- дать определение терминам «суперовуляция», «синхронизация» и «осеменение»;
- применять гормональные препараты с целью вызывания полиовуляционной реакции в яичниках донора;
- синхронизировать с помощью гормонов половые циклы между донорами и реципиентами;
- определять и вычислять уровень суперовуляции из расчета на донора;
- выявлять и регулировать факторы, влияющие на уровень суперовуляции;
- организовать работу по осеменению самок-доноров.

* * *

Содержание в яичниках самок млекопитающих огромного запаса ооцитов не оставляет сомнения. Так, у 5 - месячного плода человека имеется около 6 млн. ооцитов, к моменту рождения их остается 1 млн., к 7 - летнему возрасту – 300 тыс., а к началу половой деятельности – 40 – 80 тыс.

В яичниках половозрелых овец содержится примерно от 12000 до 86000 мелких фолликулов (менее 2-х слоев зернистых клеток) и от 100 до 400 более крупных развивающихся фолликулов. Подобная динамика популяции гамет (у самцов намного больше) отмечается и для других видов млекопитающих.

В среднем, фолликулу требуется около 6 мес., чтобы от стадии с тремя слоями зернистых клеток вырасти до предовуляторной стадии. У овец образование антрума начинается, когда диаметр фолликулов достигает 0,2 – 0,3 мм. До диаметра 0,4 мм фолликул растет медленно, затем рост его ускоряется и достигает максимума при диаметре 0,7 мм. После того, как фолликул достигнет размера 2 мм, скорость роста начинает снижаться и у предовуляторного фолликула прекращается полностью. Установлено, что фолликулу требуется приблизительно 24 дня, чтобы вырасти от стадии первого проявления антрума до предовуляторной фазы. Но, к сожалению, большинство развивающихся фолликулов подвергается атрезии и лишь немногие из них овулируют, и используются в воспроизводстве (табл.8.1.).

Таблица 8.1. Потенциальная возможность яичников и фактическое использование репродуктивных клеток в размножении сельскохозяйственных животных

Вид животного	Число (среднее)			
	имеющихся репродуктивных клеток в яичниках, тыс.	овуляций за один эстральный цикл	оплодотворенных ооцитов в одном цикле	потомко в год
Корова	100–200	1–2	1–2	1
Овцематка	100–200	1–6	1–5	1–4
Свиноматка	120–250	7–15	10–12	10 – 12
Кобыла	100–150	1–2	1	1

Признаки атрезии заметны в преантральных и антральных фолликулах диаметром менее 1мм. Атрезия антральных фолликулов происходит во всех стадиях цикла яичника. Так, процент фолликулов, вступивших в процесс атрезии, составляет 28 - 34 у овец и 33 - 44 – у коров, что свидетельствует о том, что число фолликулов, в среднем, ежегодно уменьшается на 2 тыс.

Следовательно, предпосылками для использования метода суперовуляции послужили следующие биологические особенности самок животных:

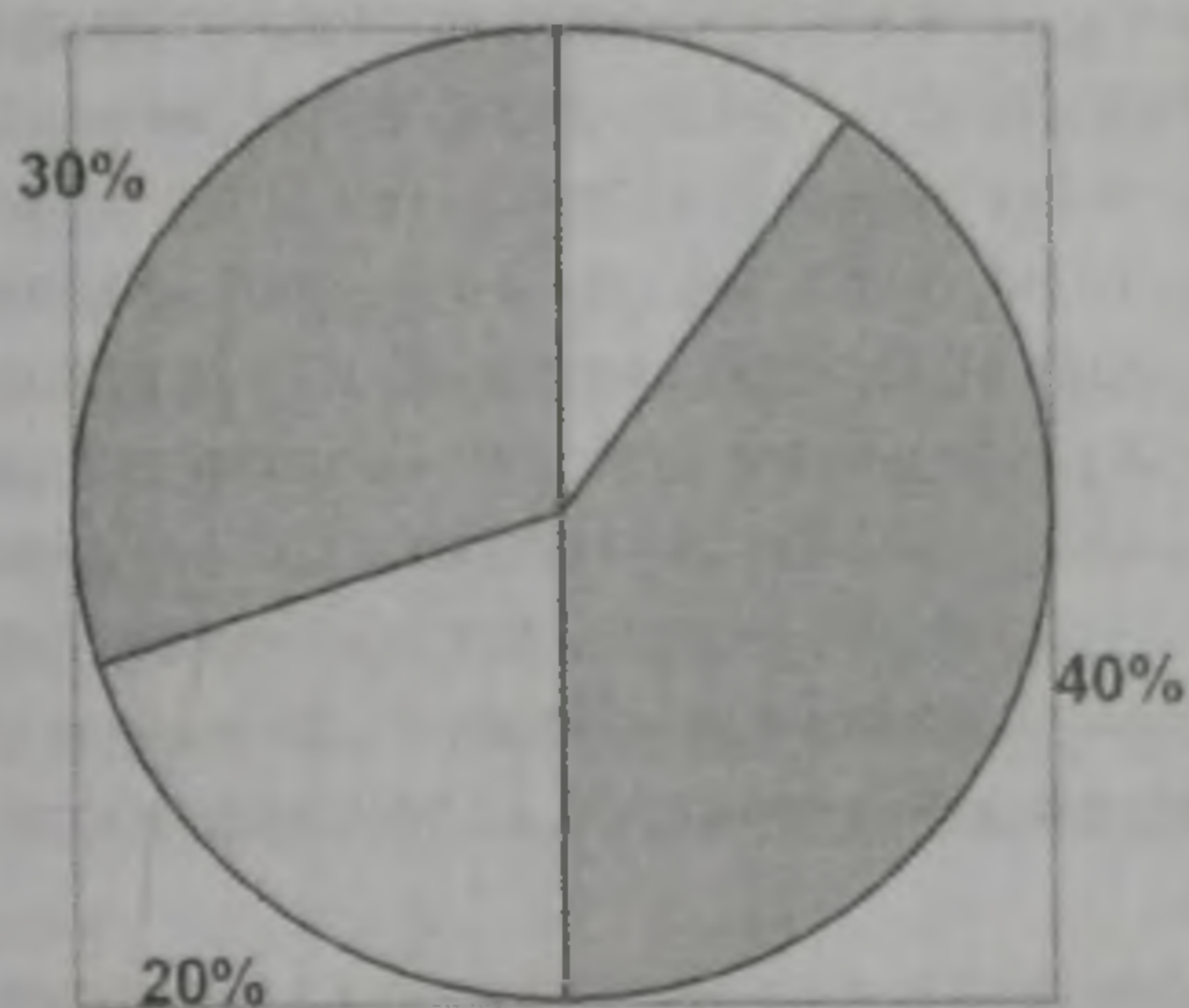
1. Наличие огромного запаса фолликул в яичниках.
2. Наличие гормонов репродукции, с использованием которых можно обеспечить суперовулированный фолликулогенез.

Методы биотехнологии воспроизводства настолько тесно связаны друг с другом, что необходимо аккуратно и четко следовать всем предписанным работам. Как уже было отмечено, биотехнология воспроизводства складывается из следующих этапов работ:

- 1) отбор производителей, доноров и реципиентов;
- 2) суперовуляция и осеменение доноров;
- 3) трансплантация эмбрионов.

Первый этап работы необходим для того, чтобы обеспечить размножение ценных по генотипу животных (задача выполнима при использовании низко продуктивных самок - реципиентов).

Этапы работ по биотехнологии
воспроизводства
10%



<input type="checkbox"/> Отбор	<input type="checkbox"/> Суперовуляция
<input type="checkbox"/> Осеменение	<input type="checkbox"/> Трансплантация

Рисунок 8.1. Распределение этапов работ по биотехнологии воспроизводства (весь процесс работы принят за 100%): 1 – отбор – 10%; 2 – суперовуляция – 40%; 3 – осеменение – 20%; 4 – трансплантация – 30%.

Второй этап работы необходим для того, чтобы получить суперовулированный фолликулогенез от генетически ценных самок - доноров. Третий этап работы обеспечивает ускоренное размножение ценных по генотипу животных. При этом

следует отметить, что успех в трансплантации эмбрионов определяется, прежде всего, методом суперовуляции (рис. 8.1.).

Как видно из диаграммы, представленной на рисунке 8.1, наиболее ответственным периодом является для работы по биотехнологии воспроизводства животных метод суперовуляции, так как на ее долю приходится 40% работы. Значение этого этапа работы настолько велико, что если суперовуляционного фолликулогенеза не происходит в одном цикле у индуцированной самки - донора, то провести трансплантацию эмбрионов не возможно. Следовательно, положительная суперовуляционная индукция обеспечивает успех в работе по получению биологически полноценных эмбрионов при осеменении (20%) и трансплантации (30%). При этом следует обратить внимание, что 10% работы выделяется отбору и подбору родителей (биологические родители и физиологическая мать). А это значит, что методы биотехнологии воспроизводства в животноводстве нужны, прежде всего, для того, чтобы обеспечить ускоренное размножение только ценных по генотипу животных. Но не следует забывать, что значение каждого этапа для получения конечного результата велико. Поэтому необходимо уделять должное внимание каждой процедуре, только в этом случае возможно получение трансплантатов, отличающихся высоким генотипом.

8.1. Суперовуляция самок-доноров

Естественная «репродуктивная пассивность» самок направило научные исследования к тому, чтобы найти возможность получения множественной овуляции с целью увеличения количества приплода, что важно для животноводства.

Стимуляция роста и развития дополнительных фолликулов яичника в одном половом цикле при помощи экзогормонов называется *суперовуляцией* (суперовулированный фолликулогенез). Число дополнительных овуляций за один цикл в этом случае варьирует в больших пределах (от 0 до 45 и более), что зависит от многих факторов. Организм, а именно яичник донора может реагировать на вводимые гормоны (экзогормоны) положительно и отрицательно.

При положительной реакции яичников число овуляций варьирует от 3 до 45 и более, при отрицательной – яичник может ответить двояко:

- либо отсутствием овуляции (в этом случае число овуляций составит 0);
- либо формированием на яичниках патологических образований (чаще всего происходит возрастание веса яичника, которое в последствии переходит в кистозное образование).

Следовательно, реакция в яичниках будет *суперовулированной*, если число дополнительных овуляций составит для одноплодных животных 3 и более, а для многоплодных – увеличится вдвое по сравнению с нормой овуляцией. При этом реакция суперовуляции будет успешной, если в яичниках животных содержится достаточное количество фолликулов определенного диаметра, наиболее чувствительных к действию гормонов. Для овец такие фолликулы имеют диаметр 0,7–2 мм, коров – 1,5–2,3 мм. Эти фолликулы могут созреть под влиянием инъекции гонадотропина в течение 4–5 дней.

Непредсказуемая реакция яичников на вводимый гормон – эта важная особенность индивидуума при их гормональной обработке. Так, из сельскохозяйственных животных хорошо реагируют на гормональную обработку коровы, овцы,

свиньи; сложно реагируют кобылы (регулирование воспроизводительных свойств кобыл на сегодняшний день остается еще затруднительным). Кроме того, имеются межпородные различия в реакциях яичников на гормональную обработку.

При инъекции экзогормонов с целью получения множественной овуляции, наряду с возрастанием числа зрелых ооцитов пригодных для оплодотворения, увеличивается число дегенерирующих яйцеклеток, которые не способны к развитию. Это объясняется тем, что препараты, применяемые для этой цели, обладают как фолликулостимулирующей, так и лютеинизирующей активностью. Негативные последствия таких препаратов сводятся к тому, что, во - первых, в момент начала обработки, в яичниках находятся фолликулы на разных стадиях развития, некоторые из них не успевают полностью сформироваться под действием фолликулярного гормона, а примесь лютеинизирующего гормона может привести к преждевременной их овуляции; во - вторых, эти препараты приводят к возрастанию прогестерона в крови, которое может блокировать предовуляторный выброс эндогенного лютеинизирующего гормона, что ведет к асинхронному развитию фолликулов и, в итоге, наблюдается их лютеинизация без овуляции. Поэтому желательно непосредственно перед обработкой гормональными препаратами, обладающими фолликулостимулирующей активностью, определять уровень прогестерона в середине лютеальной фазы полового цикла. Уровень прогестерона в крови животных составляет примерно 3 мг/мл с общим уровнем холестерина 130 мг/мл.

Кроме того, у суперовулировавших доноров высокий уровень эстрогенов приводит в организме к следующим физиологическим изменениям репродуктивной системы:

во-первых, усиливается подвижность яйцеводов и матки, вызывая ускоренный переход яйцеклеток к месту имплантации и их изгнание;

во-вторых, приводит у эмбрионов к преждевременному сбрасыванию прозрачной оболочки, что ведет к дегенерации.

Современные схемы вызывания суперовуляции ориентированы на введение препаратов в лютеальную фазу. В этом случае уровень множественной овуляции и их оплодотворяемость зависят от «чистоты» удаления желтого тела из яичника. Поэтому важно правильно подобрать дозу вводимого препарата. Если она слишком мала, то суперовуляция может не возникнуть, так как полное удаление желтого тела не произошло. Если же доза велика, то возрастает доля неоплодотворенных яйцеклеток и дегенерирующих эмбрионов, что ведет к уменьшению общего количества полноценных эмбрионов. Кроме того, повышенные дозы гонадотропных препаратов способствуют возникновению у животных - доноров таких нежелательных последствий, как возрастание веса яичников вследствие формирования патологических образований (кист).

Следует отметить, что при повторных обработках наблюдается снижение чувствительности доноров на гонадотропин, что обусловлено нарастанием уровня гонадотропин - антител. При повторных обработках положительная реакция яичников на гонадотропины снижается по сравнению с первой на 35 - 40%.

Исходя из вышеизложенного, следует, что главная проблема в гормональном вызывании суперовуляции заключается в непредсказуемости полученных результатов.

Преимуществами метода суперовуляции в животноводстве являются:

1. Максимальное использование биологического банка ооцитов у ценных по генотипу самок животных в результате роста и созревания дополнительного числа фолликулов.

2. Суперовулированный фолликулогенез способствует, во-первых, получению ценных зигот при осеменении самок-доноров и, во-вторых, применению методов трансплантации эмбрионов для ускоренного размножения ценных генотипов животных.

3. Проведение фундаментальных исследований для изучения и раскрытия репродуктивных качеств, которые выражаются у самок животных с помощью фолликулогенеза, оогенеза и оплодотворения.

К недостаткам метода суперовуляции можно отнести:

1. Одна и та же схема и доза на самок животных, принадлежащих одному виду или породе, влияет неадекватно, поэтому реакция яичников на вводимые гонадотропины непредсказуема.

Таблица 8.2. Препараты для провоцирования охоты и овуляции

Тип препарата	Характеристика
ГСЖК	Гликопротеид с молекулярной массой 68000, содержит много активного ЛГ. Гонадотропин эмбрионального происхождения. Молекула ГСЖК обладает одновременно фолликулостимулирующей и лютеинизирующей активностью.
ФСГ	Гликопротеин с молекулярной массой 30000. Основным компонентом является сиаловая кислота, которая обеспечивает сохранение активного препарата. Препарат ФСГ получают из гипофиза всех основных видов сельскохозяйственных животных. Биологическое действие ФСГ заключается в стимуляции множественного роста фолликулов и сопровождается пролиферацией клеток гранулезы. Оптимальная доза ФСГ при суперовуляции составляет 20 – 25 мг. Препарат вводят многократно с интервалами по 12 часов. Гонадотропины с фолликулостимулирующей активностью: оваджин, PG-600, гонадостатин и др.
чМГ	Гормон получают из мочи. Он проявляет высокую ФСГ активность и вырабатывается гипофизом женщин в период после менопаузы. Этот препарат чаще используют на лабораторных грызунах, чем на сельскохозяйственных животных.
ЛГ	Гликопротеид, используют в объеме 20% от общей дозы ФСГ.
чХГ	Содержит много активного ЛГ. Вырабатывается трофобластом человеческого эмбриона на ранней стадии развития (гормон можно определить в моче на 8 - 9-й день после овуляции)

Гн-РГ (гона- дотропин рилизинг гормон или гонадо- люберин)	Вызывает выделение из гипофиза ФСГ и ЛГ. Термоста- билен. Период распада составляет 5 - 10 мин. Активную роль в стимуляции синтеза и выделения Гн-РГ играют про- стогландины группы Е. Препарат применяется для улучше- ния процессов овуляции и вводят его при втором осемене- нии в объеме 2 мг.
Простаглан- дин (ПГЛ): лиотализ, энзопрост	Общая доза 50 мг, вводят по 5 мг внутримышечно в те- чение 5 дней по 2 раза в день с интервалом 12 часов.
Прогестерон	Функция - сохранение беременности.

2. Частое применение гонадотропинов приводит к различным отклонениям, которые негативно сказываются на физиологии воспроизводства.

В подавляющем большинстве случаев метод суперовуляции применяют в сочетании с методом трансплантации эмбрионов. Оставлять эмбрионы в организме донора, подвергнутого суперовуляторной обработке нежелательно. Т.к. во-первых, число полноценных мест для имплантации ограничено и, во-вторых, измененный гормональный фон после экзогормонов сказывается негативно на развитие полученных эмбрионов.

Препараты для индуцирования суперовуляции. Препараты, используемые для вызывания множественной овуляции можно разделить на три группы.

К первой группе относятся препараты (табл.8.2.), которые обладают фолликулостимулирующей активностью. Эти препараты стимулируют рост и развитие дополнительного числа фолликулов с предохранением их от атрезии. Для этой цели используют гонадотропин сыворотки жеребых кобыл (ГСЖК), гипофизарные препараты фолликулостимулирующего гормона (ФСГ) и человеческий менапаузный гонадотропин (чМГ).

Ко второй группе относятся препараты, вызывающие овуляцию фолликулов яичника и эструс. Для этой цели используют простагландин $F_{2\alpha}$, прогестагены, человеческий хорионический гонадотропин (чХГ), гипофизарный лютеинизирующий гормон (ЛГ), аналоги люлебиринина (гонадотропин рилизинг-гормон).

Препараты для провоцирования охоты или овуляции применяют для имитации эндогенной волны гонадотропина при однократной инъекции (внутривенно или внутримышечно) незадолго до начало охоты, когда присутствуют зрелые фолликулы. Важным моментом при введении таких препаратов является то, что воздействие гонадотропина предшествует эндогенной волне и, следовательно, необходимо инъектировать до охоты. Таким образом, биологическое предназначение этих препаратов заключается в провоцировании овуляции и в формировании желтого тела.

Третью группу составляют препараты, создающие благоприятные условия для действия препаратов 1-ой и 2-ой групп. К ним относят витамины, улучшающие общий репродуктивный статус животных и антисыворотку к ГСЖК, снижающий нежелательный эффект основного препарата ГСЖК (табл.8.3.).

Таблица 8.3. Дополнительные препараты, используемые при суперовуляции	
Тип препарата	Характеристика
Витамины	Инъецируют в начале эстрального цикла. Витамин А (доза 75-150 тыс.МЕ) применяют в сочетании с витамином Е (100 мг).
Антисыворотка на ГСЖК	Применяют в первые сутки после наступления индуцированной охоты и проведенного искусственного осеменения. Доза вводимой антисыворотки должна связывать не менее одной трети применяемой дозы ГСЖК, т.е. примерно 1-2 мл.
Эстрадиол валерат	Применяют совместно с норгестаметом для подавления функции желтого тела

Таблица 8.4. Схема обработки коров-доноров препаратами ГСЖК в лютеальную фазу				
День обработки	День эстрального цикла	День индуцированного (нового) цикла	Обработка	Методика
1	10-12	-	1500 - 3000 ИЕ ГСЖК	Подкожно
3	12-14	-	750 мкг эстрофан	Внутримышечно
5	14-16	0	Охота и 2-3-х кратное осеменение	Покрывают самок производителем двукратно через 10 -12 часов после введения эстрофана
12	-	7-8	Извлечение эмбрионов	Нехирургический метод вымывания

Методы вызывания суперовуляции. В зависимости от применяемых фармакологических гормональных препаратов различают три метода вызывания множественной овуляции: 1) метод, основанный на применении внутривагинальных пессариев; 2) метод инъекции (внутривенное, внутримышечное, подкожное); 3) комбинированный метод, в котором сочетаются две методики – применение пессариев и инъекция.

В последние годы, все чаще в животноводстве начинают применять метод, при котором гонадотропины инъецируют непосредственно в матку. Данная методика по сравнению с обычными методами инъекции (внутримышечное, под-

кожное) имеет следующие преимущества: во - первых, сокращается доза вводимого препарата на 20 - 30% и, во - вторых, увеличивается выход ооцитов.

Методы вызывания суперовуляции в зависимости от видовой принадлежности. Установлено, что у коров имеются три волны фолликулярного роста: в начале, в середине и в конце эстрального цикла. В начале каждой из этих волн в яичниках коров имеется достаточное количество фолликулов оптимального размера, способных реагировать на обработку ФСГ – препаратами.

Таблица 8.5. Схема обработки коров - доноров разными дозами препарата ФСГ в лютеальную фазу эстрального цикла

День обработки	День эстрального цикла	День (нового) цикла	Обработка	
			утро	вечер
а) общая доза препарата ФСГ на одно животное составляет 50 мг				
1	8		5 мг ФСГ	5 мг ФСГ
2	9		5 мг ФСГ	5 мг ФСГ
3	10		5 мг ФСГ	5 мг ФСГ
4	11		5 мг ФСГ 500 мкг эстрофан	5 мг ФСГ 250 мкг эстрофан
5	12		5 мг ФСГ	5 мг ФСГ
6	13	0	Охота	Осеменение
7		1	Осеменение	Осеменение
13		7	Извлечение эмбрионов	
б) общая доза препарата ФСГ на одно животное составляет 26 мг				
1	8		4 мг ФСГ	4 мг ФСГ
2	9		3 мг ФСГ	3 мг ФСГ
3	10		3 мг ФСГ	3 мг ФСГ
4	11		2 мг ФСГ и 25 мг лютализ	2 мг ФСГ
5	12		1 мг ФСГ	1 мг ФСГ
6		0	Охота	Осеменение
7		1	Осеменение	Осеменение
13		7	Извлечение эмбрионов	

Современные схемы индуцирования суперовуляции ориентированы на стимуляцию роста фолликулов второй волны, чему способствует применение ПГ -

$F_{2\alpha}$, так как последний прерывает половой цикл в любое время. Препараты фолликулостимулирующего действия вводят в лютеальную фазу (на 8 - 12 день полового цикла), а эструс вызывают путем введения аналогов простагландина $F_{2\alpha}$.

Обработку коров - доноров ГСЖК производят за 4 - 5 дней до предполагаемой охоты и не ранее чем через 60 дней после отела (табл.8.4.).

Для индукции суперовуляции применяют также гипофизарный гормон в дозе 20 - 50 мг на корову - донор (табл.8.5.). По имеющимся сведениям именно эта методика более приемлема для коров, так как этот препарат способствует увеличению годных к трансплантации эмбрионов, чем при применении препарата ГСЖК.

Для повышения выхода эмбрионов коровам - донорам в начале проявления охоты внутримышечно инъецируют витамин А в дозе 120 - 150 тыс.МЕ и витамин Е в дозе 80 - 100 мг. Одновременно в течение 18 - 28 дней один раз в сутки с кормом дают йодистый калий в дозе 100 - 200 мг на одну голову.

У половозрелых (циркулирующих) свинок ГСЖК инъецируют в дозе 750 - 1500 МЕ на 15 - 16-й день полового цикла (охота проявляется в течение 3 - 4 дней после обработки), а на 18 - 19-й день вводят внутривенно 500 ИЕ ЧХГ.

Овцы отличаются сезонным характером размножения, для них воспроизводительная функция проявляется осенью, поэтому основная работа по трансплантации приурочивается к этому периоду.

Существует основной механизм, который контролирует уровень суперовуляции у различных пород овец, хотя количество выделившихся яйцеклеток может изменяться от целого ряда экспериментальных процедур. Рост и развитие фолликулов регулируется равновесием между гормонами яичника и секрецией гонадотропинов из гипофиза. Изменение этого равновесия может дать ключ к осуществлению первоначального контроля механизма уровня суперовуляции.

Экзогенные гонадотропины, действуют непосредственно на яичник. Для этой цели широко используют ГСЖК. Используемые дозы ГСЖК варьируют от 500 до 1300 ИЕ, а число выделившихся яйцеклеток изменяется от 0 до 30 и более.

ГСЖК приводит к быстрому росту продукции эстрадиола в яичниках и увеличению числа фолликулов, секретирующих большее количество эстрадиола. При этом количество неатретических фолликулов диаметром более 3 мм увеличивается, а диаметром 2 - 2,5 мм - уменьшается. Возможно, что ГСЖК повышает норму овуляции посредством предотвращения атрезии фолликула и стимулирования развития большего числа фолликулов. Однако скорость перехода мелких фолликулов в категорию диаметром более 2 мм также возрастает. Реакция отдельных самок к экзогенным гонадотропинам непостоянна, и, вероятно, увеличивается с возрастанием дозы гонадотропина. Главная причина такой изменчивости - различное количество фолликулов, способных реагировать на гонадотропин в период обработки.

Для гормонального вызывания суперовуляции отбирают овец с естественным эстральным циклом. Обработку животных проводят обычно в самую позднюю фазу желтого тела полового цикла, т.е. на 12 - 13-й день (табл.8.6.). Все они предусматривают подкожную инъекцию гонадотропина ГСЖК в дозе 30 ИЕ на 1 кг живой массы. Через 48 часов после ввода ГСЖК внутримышечно инъецируют эстрофан (0,25 мл) или в день охоты внутривенно инъецируют ЧХГ (750 - 1000 ИЕ). В некоторых случаях между инъекцией ГСЖК (на 12-й день) и ЧХГ (в день охоты) применяют на 14-й день инъекцию простагландина в дозе 125 - 250 мкг.

Среднее число овуляций составляет 5 – 10 в расчете на одного донора при лимитах от 0 до 20 (35) овуляций.

Таблица 8.6. Схема гормонального воздействия для овцематок трех генетических групп* (Садыкулов Т.С., Джамалова Г.А., Касымов К.Т., Буралхийев Б.А., 1989-2003годы)			
День полового цикла	Методика гормональной обработки		
	Грубошерстные породы	Полугрубошерстные и полутонкорунные породы	Тонкорунные породы
0 день	пессарии	пессарии	–
12 день	ГСЖК в дозе 1200–1500 ИЕ	ГСЖК в дозе 1000–1300 ИЕ	ГСЖК в дозе 500–1000 ИЕ
14 день	Эстрофан в дозе 0,25 мг	Эстрофан в дозе 0,25 мг	Эстрофан в дозе 0,25 мг
16 день	Выявление охоты, осеменение		
18 день	Вымывание эмбрионов и пересадка их в гениталии реципиентов		
20 день			
* - дозы усреднены.			

Кроме того, в овцеводстве все большее применение получает метод внутри вагинальных пессариев (мелкопористое полиуретановые губки, пропитанные этаноловым или пропилен-гликолевым раствором прогестагенов). Пессарии вставляют во влагалище на 14 - 16 дней, а при комбинированном использовании – в день выявления охоты (табл.8.6.).

В последнее время все большее распространение получает использование препаратов ФСГ (инъекцию начинают с 10 – го дня по пятидневной схеме; общая доза – 25 мг) и пергонал (также предусматривает пятидневную схему при общей дозе 500ИЕ).

Итак, в любых экспериментальных работах невозможно смоделировать и конкретно рекомендовать ту или иную технику стимулирования множественной овуляции у самок – доноров, хотя принципы вызывания полиовуляции общие для всех животных.

Различия в реакции яичников на гонадотропин, оплодотворяемости яйцеклеток и выходу жизнеспособных эмбрионов обусловлены индивидуальными, породными и видовыми особенностями животных.

При одних и тех же условиях реакция яичников на гонадотропин различается существенно. Поэтому, на сегодняшний день до сих пор нет "идеальной" методики гормональной обработки самок.

Необходимо помнить, что предложенные здесь методики вызывания полиовуляции не являются догмой, так как каждая исследовательская группа с целью совершенствования применяет одну и ту же методику в разной "аранжировке", меняя либо дозу, либо – схему, либо – способ.

8.2. Норма овуляции и уровень суперовуляции

Как известно, плодовитость имеет основное значение в увеличении продуктивности сельскохозяйственных животных. Поэтому, понимание механизма, контролирующего рост, развитие и созревание овулирующих фолликулов, могло бы способствовать выявлению селекционных критериев генетического улучшения воспроизведения, что очень ценно для разработки новых приемов наследственно обусловленного повышения плодовитости.

Для понимания этого механизма необходимо знать о таком критерии, как норма овуляции, так как селекция по этому показателю может повысить многоплодие животных. *Норма овуляции* – это показатель, указывающий на физиологическую возможность репродуктивной активности самок и выражающийся циклическим выходом ооцитов из фолликулов. Другими словами, это генетически запрограммированное для полового цикла число овуляций с целью реализации репродуктивных качеств самки. Норма овуляции свидетельствует об активности яичника.

Таблица 8.7. Биотехнологический “продукт” при физиологическом взаимодействии донора, эмбриона и реципиента при трансплантации

Этап	Наименование работы	Получаемый Биотехнологический “продукт”	Сохранность, %	Способ определения	Методика
1	Экзогормональное воздействие на самку-донор	Суперовулированные ооциты	100 – начало отсчета	Подсчет желтых тел на яичниках	Визуально, ректально
2	Вымывание эмбрионов	Оплодотворенные и неоплодотворенные ооциты	90-99	Выраженность зоны пеллюцида	Под микроскопом серии МБС
3	Морфологическая оценка	Полноценные и неполноценные эмбрионы	80-90	Соответствие био-стандарту*	Под микроскопом
4	Пересадка эмбрионов реципиентам	“Прижившие” и получившие развитие эмбрионы	30-50	Отсутствие эструса у реципиентов после пересадки эмбрионов	Методы, подтверждающие или опровергающие наличие беременности (биохимический анализ крови, ректально, УЗИ)

	2	3	4	5	6
5	Принятие родов у реципиентов	Трансплантаты	20-30	Рождение физиологически здорового плода	
*оценка осуществляется при сопоставлении с биологическим стандартом, что установлено для эмбрионов, находящихся на разных стадиях развития в зависимости от видовой принадлежности					

Проводя селекцию на норму овуляции можно увеличить плодовитость животных. Норму овуляции можно повысить селекцией на увеличение реактивности яичников к гонадотропинам, что позволит увеличить: 1) количество растущих фолликулов; 2) скорость роста фолликулов; 3) чувствительность яичников к гонадотропинам.

По имеющимся сведениям норма овуляции для вида находится на одном уровне. В пределах же вида, например, у сельскохозяйственных животных норма овуляции варьирует в зависимости от породной принадлежности незначительно. Так, для кобыл, коров и овец норма овуляции находится в пределах от 1,00 – до 1,09, а для морских свинок, кроликов, лабораторных грызунов и свиноматок – от 3,00 до 12,00. Эти показатели свидетельствуют о том, что у самок данных видов за один цикл овулирует: у кобыл, коров и овец – один и очень редко два ооцита; у морских свинок, кроликов, лабораторных грызунов и свиноматок – более трех. При этом максимальный параметр по норме овуляции среди этих животных приходится на овец (среди одноплодных) и свиноматок (среди многоплодных), а минимальный – на кобыл и морских свинок соответственно. А это, в свою очередь, характеризует более высокую вариацию по норме овуляции для овец и свиноматок, и более низкую – для кобыл и морских свинок.

Существует основной механизм, контролирующий норму овуляции у различных видов животных. Как известно, рост и развитие фолликулов регулируется равновесием между гормонами яичника и секрецией гонадотропинов из гипофиза. Поэтому изменение этого равновесия будет способствовать осуществлению контроля механизма нормы овуляции. Следовательно, увеличение нормы овуляции можно осуществить путем обработки самок экзогенными гонадотропинами, действующими непосредственно на яичник. При этом реакция яичников на экзогормональное воздействие будет полиовуляционной. Показатель, указывающий на число полученных дополнительных овуляций в одном половом цикле у гормонально обработанной самки – донора, называют уровнем суперовуляции.

В среднем, уровень суперовуляции находится для самок одноплодных животных в пределах от 3 до 15, многоплодных – от 5 – 15 до 30 – 45 шт. Следовательно, чем выше норма овуляции, тем выше уровень суперовуляции. Данное утверждение свидетельствует о высокой связи между нормой овуляцией и уровнем суперовуляции.

Уровень суперовуляции определяют визуально при лапаротомии (у животных мелкого и среднего размеров) или ректально (у животных крупного размера) путем подсчета желтых тел на яичниках. Этот показатель высоко вариабелен и зависит от эндогенных (внутренних) и экзогенных (внешних) факторов.

К эндогенным факторам относят:

1) видовую принадлежность животных (из сельскохозяйственных животных хорошо реагируют на гормональную обработку коровы, овцы, свиньи; сложно – кобылы);

2) породную особенность животных (для крупного рогатого скота более восприимчивыми являются коровы молочного направления, менее – мясного; для овец – тонкорунные и грубошерстные породы соответственно; овцы же каракульских пород реагируют на экзогормоны непредсказуемо);

3) возраст (гормональному воздействию следует привлекать самок в возрасте 2 – 3 (свиньи), 2,5 – 3,5 (овцы) или 3 – 6-ти (коровы) лет; самки моложе или старше – реагируют на экзогормоны сложнее, т.к. для молодых цикл еще окончательно не сформирован, а для старших по возрасту – уже можно наблюдать угнетение физиологических процессов;

4) срок использования самок – доноров (при повторных обработках положительная реакция яичников на гонадотропины снижается по сравнению с первой на 35 – 40%);

5) индивидуальные качества (общее физиологическое состояние, обмен веществ и гормональный статус организма) и

6) период полового цикла (современные схемы вызывания суперовуляции ориентированы на введение препаратов в лютеальную фазу полового цикла).

К экзогенным факторам относят:

1) условия кормления и содержания (этот фактор очень важен: нарушая режим в содержании и кормлении можно полностью исключить воспроизводство);

2) сезон размножения (овцы отличаются сезонным характером размножения, для них воспроизводительная функция проявляется осенью, поэтому основная работа для суперовуляции приурочивается к этому периоду);

3) качество гормональных препаратов, схема и дозы воздействия гормонов:

- если доза слишком мала, то суперовуляция может не возникнуть, так как полное удаление желтого тела не произошло;

- если доза велика, то возрастает либо доля дегенерирующих ооцитов, либо вес яичников вследствие формирования патологических образований (кист).

Таблица 8.8. Факторы, влияющие на выход "биопродукта" при взаимодействии донора, эмбриона и реципиента при трансплантации			
Этап	Получаемый "биотехнологический продукт"	Факторы, влияющие на сохранность и полноценность	
		эндогенные	экзогенные
1	Суперовулированные ооциты	1) вид и порода; 2) возраст самки – донора; 3) стадия эстрального цикла донора, подвергшего фармакологическому воздействию;	1) условия кормления и содержания; 2) совершенство методики; 3) качество гормонов, схема и доза гормональной обработки;

2	Оплодотворенные и неоплодотворенные ооциты	1) качество ооцитов (мембранное, цитоплазматическое и ядерное созревание); 2) качество спермы и сперматозоидов; 3) время осеменения;	1) условия кормления и содержания; 2) совершенство методики; 3) профессиональные качества биотехнолога-селекционера;
3	Полноценные и неполноценные эмбрионы	1) вид и порода; 2) возраст самки – донора; 3) стадия эстрального цикла донора, подвергшего фармакологическому воздействию; 4) число полученных овуляций;	1) условия кормления и содержания; 2) совершенство методики; 3) качество гормонов, схема и доза гормональной обработки;
4	“Прижившие” и получившие развитие эмбрионы	1) синхронность половых циклов между донором и реципиентом; 2) физиологическая и биохимическая взаимосвязь между эмбрионом и реципиентом;	1) условия кормления и содержания; 2) совершенство методики; 3) профессиональные качества биотехнолога-селекционера;
5	Трансплантаты	1) физиологическая и биохимическая взаимосвязь между эмбрионом и реципиентом.	1) условия кормления и содержания.

При биотехнологическом анализе в животноводстве очень важным является такой показатель, как из расчета на донора. *На донора* – это показатель усреднения биотехнологического параметра воспроизводства, получаемого от донора и указывающего на экономическую рентабельность.

В животноводстве биотехнологическими параметрами воспроизводства являются уровень суперовуляции, вымываемость эмбрионов, число вымытых биологически полноценных эмбрионов, приживляемость эмбрионов и число рожденных трансплантатов. Поэтому, проводя работу по биотехнологии воспроизводства биологическую продукцию (биоматериал), получаемую от самки – донора, можно поэтапно представить в следующий ряд:

Этап 1 – суперовулированные ооциты (при экзогормональном воздействии).

Этап 2 – оплодотворенные и неоплодотворенные ооциты (при осеменении, последующем вымывании и оценке).

Этап 3 – биологически полноценные и неполноценные эмбрионы (при морфологической оценке).

Этап 4 – прижившие и получившие развитие эмбрионы (при пересадке).

Этап 5 – полученные от реципиентов трансплантаты (при рождении, табл. 8.7.).

Следует отметить, что показатель уровня суперовуляции (этап 1) принимают за 100%. Далее, по имеющимся сведениям, каждый этап работы сопровождается потерями, которые равны: 0 – 10 – 20 – 50 – 10% (сведения усреднены) соответственно, что за весь период составляет, в среднем, 20 – 60%. При этом, эти потери складываются из следующих причин (табл. 8.8.):

1) эндогенные – вид, порода, возраст самки – донора, стадия эстрального цикла донора, подвергнутого фармакологическому воздействию с целью получения дополнительных овуляций; число полученных овуляций; физиологическая и биохимическая взаимосвязь между донором и реципиентами и между эмбрионом и реципиентом;

2) экзогенные – условия кормления и содержания животных; совершенство методики; профессиональные качества биотехнолога – селекционера; качество гормонов, схема и доза гормональной обработки.

О результатах работы при использовании биотехнологических методов воспроизводства в животноводстве можно судить по показателю, указывающего на экономическую рентабельность.

В связи с вышеизложенным можно утверждать, что биотехнологический эксперимент будет рентабельным, если на первом этапе число овуляций на донора будет составлять 6 – 12 (для одноплодных животных) или 15 – 30 шт. (для многоплодных животных: норма овуляции умножается на коэффициент 2 или 2,5-3). При меньшем числе (менее 5 и 14 соответственно) из-за поэтапных потерь эксперимент будет биотехнологически и экономически не рентабельным. При большем же числе овуляций снижается качество получаемой биологической продукции (полноценность эмбрионов и их способность к приживлению), что в конечном итоге также приводит к не рентабельности биотехнологического эксперимента. Не следует забывать, что работа, связанная с биотехнологией требует больших финансовых вложений и, поэтому, получаемый результат должен себя полностью оправдывать.

Изучение реакции яичников донора на гормональную обработку необходимо проводить разносторонне с учетом таких особенностей, как видовая и породная принадлежность, срок использования доноров и их возраст, реакция правого и левого яичников в зависимости от схемы гормонального воздействия.

8.3 Синхронизация охоты

Синхронизация охоты – это мероприятие, в котором на группу самок оказывают гормональное воздействие с целью обеспечения для них одновременности проявления эструса. В животноводстве синхронизируют половые циклы реципиентов по отношению к донорам. Синхронизацию половых циклов между донором и подобранными к ней реципиентами можно достичь естественным или искусственным путем.

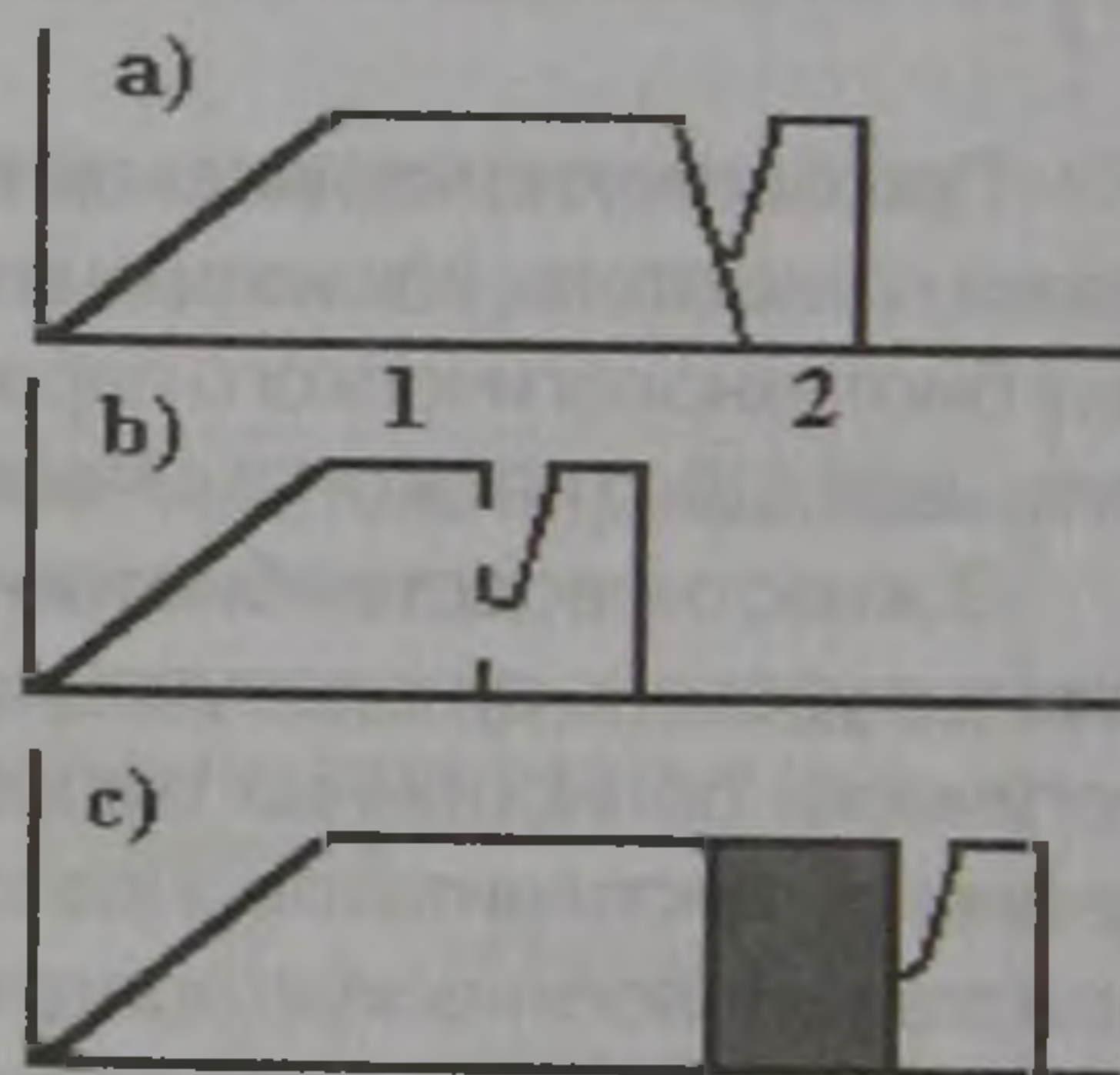


Рисунок 8.2. Методы синхронизации охоты.

1 – фаза желтого тела; 2 – фолликулярная фаза; а) половой цикл "норма"; б) половой цикл сокращен; в) половой цикл удлинен.

Естественная синхронизация сводится к тому, что к донору подбирают реципиентов с естественным течением половых циклов. В этом случае используют пробников, которые выявляют охоту не только у донора, но и у реципиентов. Самки, которые пришли в охоту одновременно с донором относят к синхронизированным реципиентам.

При искусственном методе синхронизация половых циклов достигается путем гормональной обработки реципиентов для обеспечения одновременности проявления охоты. При синхронизации на каждого донора обычно подготавливают 3 – 5 (7) реципиентов.

Точная синхронизация половых циклов между донорами и реципиентами является одним из основных условий успешной трансплантации эмбрионов.

Потребность эмбриона в питательных веществах генетически скоординирована избирательным поступлением молекул субстрата через клеточные мембраны и паратипически контролируется химическим составом жидкого содержимого яйцеводов и матки, поэтому любое нарушение синхронности в развитии эмбриона и полового тракта матери подвергает опасности будущее зародыша. При несоблюдении этой взаимосвязи происходит либо эктопическая (внематочная) беременность, либо - выкидыш.

Синхронизацию можно провести двумя методами:

- 1) удаление или индукция гибели желтого тела (рис.8.2, b);
- 2) удлинение фазы желтого тела (рис.8.2, c).

Эти два метода позволяют определенному поголовью животных обеспечить одновременность наступления фолликулярной фазы. Синхронизацию полового цикла можно достичь инъекцией либо прогестерона (влагалищные губки и др.), которые удлиняют фазу желтого тела, либо ПГ (энзапрост, лютализ, прозельвин и др.), которые индуцируют гибель желтого тела.

Применение простагландинов в синхронизации охоты у доноров и реципиентов, в яичниках которых имеются активные желтые тела на данный момент, являются наиболее перспективными. Биологическое действие ПГ связано с направленным лютеолитическим эффектом. После внутримышечной инъекции простагландина $F_{2\alpha}$ в дозе 5 мг, у коров концентрация прогестерона в крови снижается через 12 ч с 4 до 1,5 нг/мл, течка наступает через 72 ч, овуляция – через 95 ч. Особенность гормона заключается в том, что его биологическое действие проявляется лишь в фазу активного желтого тела (8-13-й день полового цикла у коров и 11-12-й день – у свиней). Препарат вводят двукратно с интервалом между инъекциями у коров в 10 – 12 дней (независимо от их настоящей половой цикличности) и, через 48 – 96 ч

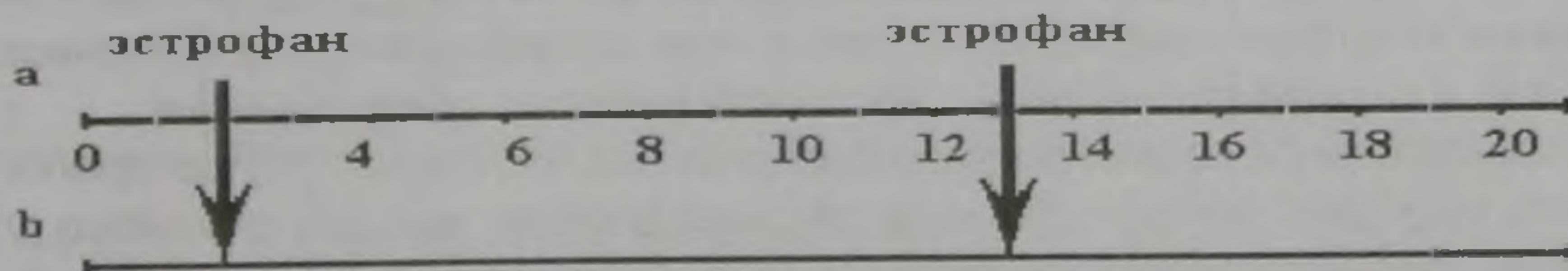


Рисунок 8.3. Синхронизация охоты у коров-реципиентов:

а – половой цикл коровы-донора; б – половой цикл коровы-реципиента; препарат (эстрофан) инъецируют двукратно (на 2-ой и 13-14-й день цикла). Приходят в охоту 85% телок; охота после второй инъекции наступает через 48-72 часа.

после второй инъекции в охоту приходят 60 – 95% обработанных животных, а овуляция наступает через 24 ч после начала провоцированной охоты (рис.8.3.). У овец интервал между введением препарата обычно равен 8 - 9 дням. Лютеолизис проходит быстро, и у животных наступает охота в течение 72 ч после внутримышечной или подкожной инъекции. У большинства животных охота наступает между 29 и 48 ч. У свиней для синхронизации используется аналог простагландина – металлибур (нестероидный гипофизарный ингибитор) на 11 - 12-й день полового цикла.

Синхронизация полового цикла между донором и реципиентами с помощью прогестагена включает несколько методов. Более подробно остановимся на методе, где применяют вагинальные пессарии. Прогестагены вводят интервагинально с помощью губок. Эти губки пропитывают маслом, которые содержат прогестаген (30 – 45 мг кронолона для овец и 50 - 70 – для коров), вводят глубоко во влагалище и оставляют их там, на 18 - 20 дней у коров, 10 - 16 дней у овец. После изъятия губки производят однократную инъекцию ГСЖК в дозах 750 – 1500МЕ и 350 – 700МЕ соответственно. Признаки охоты проявляются у коров и овец через 24 – 72 ч.

Чтобы обеспечить оптимальную приживляемость эмбрионов после трансплантации, требуется точная синхронизация, но, к сожалению, на практике это не всегда удается. Синхронизация обеспечивает правильное физиологическое взаимодействие между донором, эмбрионом и реципиентом при трансплантации. В связи с этим существуют определенные пределы точности синхронизации между половыми циклами донора и подготовленных к ним реципиентов, а также стадией развития матки со стадией развития эмбриона. У крупного рогатого скота разница в возрасте эмбриона и стадии развития матки может составлять ± 12 ч (точка отсчета – время наступления овуляции), а у овец – ± 24 ч.

8.4 Осеменение самок-доноров

При разведении животных применяют два способа осеменения доноров: естественное и искусственное. При естественном осеменении задача исследователя заключается в отборе и подборе родительских пар для того, чтобы они могли осуществить коитус (половой акт). При искусственном осеменении сперму вводят в половые пути доноров специальными приборами (рис.8.4.).



Рисунок 8.4. Упрощенная схема стросния катетера.

В практике при трансплантации эмбрионов у лабораторных и сельскохозяйственных животных малого размера в основном применяют естественное осеменение, а у крупных животных, в частности у коров – искусственное.

Искусственное осеменение основано на том, что эякулят половозрелого животного содержит намного больше сперматозоидов, чем это требуется для успешного оплодотворения одной самки. Метод искусственного осеменения сельскохозяйственных животных включает следующие технологии: получение, оценка, разбавление спермы, сохранение спермы вне организма и осеменение.

Сперму от производителей получают методом искусственной вагины (рис.8.5.). Полученный эякулят перед обработкой тщательно исследуют.

Объем эякулята у производителей, в среднем, составляет 4 - 8 мл. А для осеменения обычно требуется 0,25 - 1,0 мл, поэтому очевидно, что разбавление свежеполученной спермы является вторым шагом в подготовке проведения искусственного осеменения. Для разбавления и кратковременного хранения спермы производителя при 2 - 5⁰С применяют, в основном, глюкозо-цитратно-желточную (ГЦЖ) или молочно-желточную (МЖ) среду (табл.8.16; 8.17.).

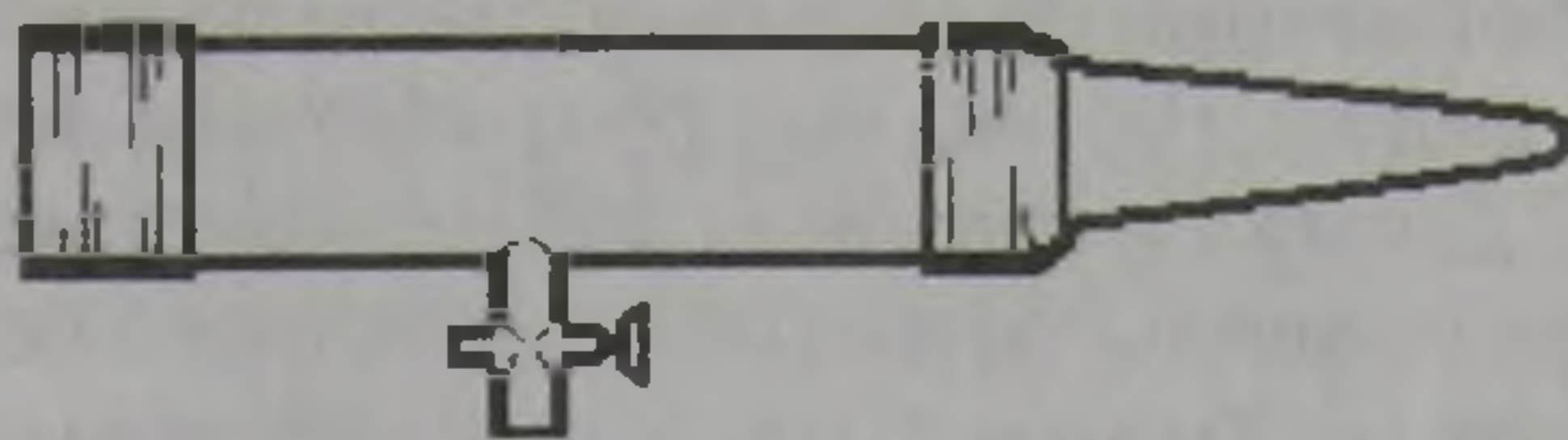


Рисунок 8.5. Упрощенная схема строения искусственной вагины.

Таблица 8.16. Состав сред, используемых для разбавления спермы быка

Состав среды	Среда	
	ГЦЖ	МЖ
Вода дистиллированная, мл	100	-
Свежее молоко, мл	-	100
Желток куриного яйца, мл	20	20
Глюкоза медицинская безводная, г	3	-
Натрий лимоннокислый трехзамещенный пятиводный, г	1,4	-
Спермосан, тыс.ед.	79-90	-

Сперму разбавляют после получения и оценки при температуре 30 - 35⁰С в мензурке в 10 - 20 - 50 раз и более. После разбавления сперму охлаждают до температуры, близкой к 5⁰С, т.к. это способствует уменьшению подвижности сперматозоидов. Охлажденная сперма успешно используется для осеменения в течение 3-х дней.

Таблица 8.17. Состав сред, используемых для разбавления спермы барана

№	Состав среды	Количество
1	Вода дистиллированная, мл.	100
2	Глюкоза, г.	0,8
3	Цитрат натрия, г.	2,8
4	Желток куриного яйца, мл.	20
5	Спермосан, тыс.ед.	50-75

В Казахском научно-исследовательском технологическом институте овцеводства (ныне филиал юго - восточного Казахского научно-производственного центра животноводства и ветеринарии) в лаборатории по воспроизводству и биотехнологии животных разработали методику кратковременного хранения спермы при температуре 18 - 24⁰С. Коллективом этой

лаборатории под руководством профессора Касымова К.Т. и его учениками ведутся успешные разработки в этом направлении.

Доля качественных эмбрионов при суперовуляции во многом определяется правильностью искусственного осеменения самок - доноров. Прежде всего, необходимо точно выбрать время осеменения. Как известно сперматозоиды приобретают оплодотворяющую способность лишь через некоторое время после попадания в половые пути самки, находящейся в период охоты. Овуляция происходит примерно через 12 ч. после начала охоты. Поэтому, осеменяя во время охоты, Вы создаете оптимальные условия для успешного оплодотворения.

При осеменении суперовулированных самок - доноров в связи с их гормональной насыщенностью необходимо учитывать физиологические изменения генитального аппарата, которые сопровождаются тем, что:

1) в рост и развитие вовлекается дополнительное число фолликулов яичника;

2) ускоряется темп роста и развития фолликулов и ооцитов;

3) по продолжительности удлиняется период эструса.

Поэтому, осеменяя таких доноров нужно:

во-первых, увеличить кратность покрытия до 2 - 3 раз с интервалом в 10 - 12 часов и,

во-вторых, если используется искусственное осеменение, то каждую порцию спермадозы необходимо увеличить вдвое.

Резюме

Изучение вопросов, касающихся методов регулирования половых циклов самок имеет большое значение в животноводстве. Используя метод суперовуляции, Вы повышаете уровень овуляции в допустимых для размножения пределах, что очень важно, когда речь идет об ускоренном размножении ценных генотипов животных. Благодаря этому методу Вы проводите селекцию самок на многоплодие путем увеличения такого генетического параметра, как норма овуляции.

Важная особенность проявления охоты у суперовулированного донора сводится к тому, что, *во-первых*, удлиняется период охоты и, *во-вторых*, увеличивается выход ооцитов. Поэтому с целью повышения оплодотворяющей способности суперовулированных ооцитов необходимо увеличить как число садок (до трех с интервалом 10 - 12 ч.), так и удвоить спермадозу (при искусственном осеменении). При этом, используя синхронизированных к донорам самок, Вы повышаете инкубационные возможности гениталий реципиентов.

Кроме того, при использовании методов количественной биологии Вы можете анализировать сведения, получаемые от суперовулированных доноров и, тем самым, изучать и регулировать факторы, влияющие на уровень суперовуляции.

Ключевые слова и понятия:

Антисыворотка	Простагландины
Атрезия фолликула	Синхронизация охоты
Вагинальные пессарии	Спермадоза
Витамины	Суперовуляция
Гонадотропин	Схема гормонального воздействия
Индукция множественной овуляции	Сыворотка жеребых кобыл
Искусственная вагина	Фолликул
Методы вызывания суперовуляции	Человеческий менопаузальный гонадотропин
Методы синхронизации охоты	Человеческий хорионический гонадотропин
Осеменение	Экзогенные факторы
Потенциальная возможность яйчника	Эндогенные факторы
Пределы точности синхронизации	Эстрогены
Прогестерон	Яйчник: реакция на экзогормон

Контрольные вопросы:

1. Дать определение терминам «суперовуляция» и «синхронизация охоты».
2. Дать разъяснение следующим понятиям «потенциальная возможность яйчника» и «фактическое использование яйцеклеток».
3. В каких случаях возникает атрезия фолликулов?
4. Какие факторы влияют на характер суперовуляции?
5. В каких случаях реакция суперовуляции будет успешной?
6. Какие по размеру фолликулы реагируют на экзогормоны положительно?
7. В какую фазу полового цикла вводят гормональные препараты с целью вызывания множественной овуляции?
8. Зависит ли схема гормонального воздействия от видовой принадлежности самки? И если да, то почему?
9. Какие последствия от гормонального воздействия можно ожидать при малых дозах, а какие – при больших дозах?
10. Какие группы препаратов применяют для вызывания суперовуляции?
11. Какие животные имеют высокую, а какие – низкую восприимчивость к экзогормонам?
12. Что собой представляет норма овуляции и уровень суперовуляции? Есть ли между этими понятиями разница?
13. Какие факторы влияют на норму овуляции?
14. От каких показателей зависит норма овуляции?

15. Какие факторы влияют на уровень суперовуляции?
16. Можно ли избежать влияние эндогенных факторов при вызывании суперовуляции, если улучшить экзогенные?
17. В каких пределах находится уровень суперовуляции у разных видов животных?
18. Как определяется уровень суперовуляции в зависимости от видовой принадлежности животного?
19. Какую биологическую продукцию получают при выполнении работ, связанных с биотехнологией воспроизводства?
20. По скольким этапам ведется учет при выполнении работ по биотехнологии воспроизводства?
21. Какие показатели влияют на получение биологической продукции по биотехнологии воспроизводства животных?
22. В каких случаях биотехнологический эксперимент будет экономически рентабельным, а в каких – не рентабельным?
23. Методы синхронизации. Какие факторы влияют на выбор методики?
24. Сколько реципиентов подготавливают на одного донора?
25. Какие критерии нужно учитывать между донорами и реципиентами для обеспечения оптимальной приживляемости эмбрионов?
26. Каковы пределы точности синхронизации между половыми циклами донора и подготовленных к ним реципиентов в зависимости от видовой принадлежности?
27. Каким способом осеменяют доноров?
28. Для какой цели разбавляется сперма производителя?
29. Каким образом вводится сперма производителя при искусственном осеменении?
30. Какие особенности необходимо учитывать при осеменении суперовулированных доноров?

Дополнительная литература. Во избежание повторений Вы получили в этой главе очень краткую информацию по вопросам искусственного осеменения. Очень подробно и доступно этот материал раскрыт в учебниках А.П.Студенцова, М., 1980г. (Ветеринарное акушерство и гинекология), В.С.Шипилова, М., 1988г. (Практикум по акушерству, гинекологии и искусственному осеменению сельскохозяйственных животных). Кроме того, Вы можете обратиться к работам *Ruth M. Gatenby. Sheep. London and Oxford, 1991*; *Bowman J.G., An introduction to animal breeding, London, 2nd edition, 1984*. Для изучения этого вопроса с научной точки зрения заинтересованному читателю можно обратиться к научным журналам серии животноводства (по отраслям). При вычислении уровня суперовуляции и выявления факторов, оказавших положительное влияние на реакцию яичников донора советуем обратиться к работам Г.Ф.Лакина, М., 1990 (Биометрия) и Е.К.Меркурьева, М., 1970 (Биометрия в селекции и генетике сельскохозяйственных животных).

Очень подробную информацию по вопросам искусственного осеменения Вы можете также получить, обратившись к трудам сотрудников лаборатории по искусственному осеменению и трансплантации эмбрионов: Касымов К.Т., Аuezбаев С.А., Калмаков Н.И. и др.

Глава 9. Трансплантация эмбрионов животных

Цель: Ознакомиться с биотехнологическим методом воспроизводства животных – трансплантацией эмбрионов.

После изучения главы студент сможет:

- охарактеризовать методы трансплантации эмбрионов, применяемых у животных в зависимости от их размеров;
- изучить состав биоматериала, получаемых от самок-доноров в зависимости от времени вымывания эмбрионов;
- определять выход эмбрионов у самок-доноров из расчета на донора с учетом их полноценности;
- определять процент потерь эмбрионов от числа овуляций при вымывании;
- выявлять и регулировать факторы, влияющие на выход эмбрионов у самок-доноров;
- определять для реципиентов процент приживляемости пересаженных эмбрионов в зависимости от числа и стадии использованных эмбрионов;
- выявлять факторы, влияющие на приживляемость трансплантируемых эмбрионов;
- проводить исследования по биотехнологии в животноводстве с применением методов эмбриотрансплантации.

* * *

Биотехнология трансплантации эмбрионов подразумевает проведение следующих работ:

1. Отбор доноров, производителей и реципиентов. При отборе основными критериями для животных являются биологические (возраст), физиологические (здоровье и воспроизводительные качества) и зоотехнические (продуктивность) особенности.

2. Подбор матерей: мать - донор и матери - реципиенты. При подборе матерей основным критерием для самок животных является физиологический показатель, указывающий на синхронность проявления охоты у самок-доноров и самок - реципиентов.

Для этого этапа работы необходимым условием является гормональное воздействие на самок: от доноров получают суперовулированный фолликулогенез, от реципиентов – синхронизированную с донором охоту.

3. Осеменение доноров. При осеменении суперовулированных самок - доноров следует учитывать то, что их организм насыщен гормональными препаратами. Такая насыщенность в гормональном статусе обязательно сопровождается следующими физиологическими преобразованиями: 1) увеличивается продолжительность охоты; 2) увеличивается количество овулирующих фолликулов; 3) сокращается период, необходимый для созревания фолликулов.

Поэтому, при осеменении суперовулированных самок - доноров нужно выполнять следующие требования: 1) увеличить количество садок с 1-го до 2 - 3-х раз; 2) интервал между покрытиями должен составлять 10 - 12 часов; 3) при искусственном осеменении вводят вдвое увеличенную спермадозу.

4. Трансплантация эмбрионов – это метод, состоящий из трех обязательных процедур:

4.1. Вымывание эмбрионов из гениталий доноров.

4.2. Оценка и селекция эмбрионов в условиях *in vitro*.

4.3. Пересадка биологически полноценных эмбрионов в репродуктивные органы реципиентов.

5. Изучение роста и развития трансплантатов в зависимости от пола. Рост и развитие трансплантатов изучают при сравнении со сверстниками из контрольной группы.

Таким образом, трансплантация эмбрионов – это биотехнологический метод воспроизводства, позволяющий при суперовуляции получать максимальное число биологически полноценных эмбрионов от самок - доноров в целях пересадки их в репродуктивные органы самок - реципиентов.

Предпосылками для метода трансплантации эмбрионов послужили следующие биологические особенности организма самок животных:

1. Наличие в яичниках самок огромного запаса ооцитов.

2. Предимплантационное развитие эмбриона, что предполагает его свободное перемещение от места оплодотворения (ампула фаллопиевой трубы) к месту имплантации (матка).

3. Морфологическое строение органов репродукции, которая позволяет извлекать эмбрионы методом вымывания.

9.1 Вымывание эмбрионов

Предимплантационные эмбрионы из гениталий доноров можно извлечь только путем вымывания. Вымывание эмбрионов – это метод, обеспечивающий извлечение эмбрионов из органов репродукции (фаллопиевой трубы и матки). Метод основан на применении питательной среды. Для извлечения эмбрионов питательную среду пропускают либо через фаллопиеву трубу (при хирургическом методе), либо через матку (при нехирургическом методе).

Таблица 9.1. Преимущества и недостатки методов трансплантации

№	Показатель	Метод	
		хирургический	нехирургический
1	Сфера применения	Овцеводство, свиноводство	Скотоводство
2	Преимущество	Безошибочное определение уровня суперовуляции.	Сохранение хозяйственной службы самок (при высокой квалификации биотехнолога-селекционера).
		Высокий процент вымываемости эмбрионов у донора.	Метод сопровождается хорошими (выше среднего) показателями приживляемости пересаживаемых эмбрионов (35 - 55% от числа используемых в пересадке эмбрионов)
		Эмбрионы можно извлечь на разных стадиях предимплантационного развития.	
		Безошибочное применение ипсилатеральной стороны яйцевода и рога матки у реципиентов при пересадке.	Методика отличается простотой.
3	Недостаток	Низкий (ниже среднего) процент приживляемости эмбрионов (22 - 35% от числа пересаженных эмбрионов)	Недостаточно точно определяется уровень суперовуляции.
		Из-за воспалительных процессов, возникающих в фаллопиевой трубе и матке (приводящие к бесплодию), снижается срок службы самок до 2. реже до 3 ^х лет.	Эмбрионы можно извлечь только на стадии морулы и бластоцисты, когда они попадают в рог матки
			Нарушается целостность цервикального канала.
		Методика сложна, требует дополнительных финансовых и трудовых затрат.	Сложность соблюдения условий асептики.
Много времени затрачивается на исследование эмбрионов в промывной жидкости.			

В животноводстве используют три метода вымывания эмбрионов: 1) после убоя самок – доноров (у лабораторных грызунов и в мясном скотоводстве); 2) хирургический (у животных мелкого и среднего размера); 3) нехирургический (у животных крупного размера).

Каждый из применяемых методов трансплантации (хирургический и нехирургический) имеет положительные и отрицательные стороны (табл.9.1.).

При вымывании эмбрионов различают три периода: подготовительный, период вымывания и период после вымывания (табл.9.2.).

Вкратце рассмотрим все три метода вымывания эмбрионов. Извлечение эмбрионов методом убоя широко применяют у лабораторных мышей в связи с их малыми размерами. Другие методы извлечения из-за трудоемкости и ненадежности используют на них очень редко.

Для этой цели сначала мышей забивают в камерах -контейнерах с дву-окисью углерода или смещением шейных позвонков, а затем половой тракт освобождают от прилегающих тканей, отрезают их в соответствующих местах и переносят в чашки Петри. После чего эмбрионы вымывают из яйцеводов (рис.9.1,b; первый метод) или рогов матки (рис.9.1,c; второй метод).

При первом методе извлечения эмбрионы вымывают на стадиях зиготы и ранних стадий дробления, при втором методе – на стадиях морулы и бластоцисты. Для первого метода доноров забивают через 12 - 48 (56) часов, для второго метода – на 3 - 5-й день после овуляции.

Метод трансплантации эмбрионов, при котором осуществляется совокупность механических воздействий, приводящих к нарушению целостности ткани при осуществлении доступа к гениталиям самок животных, называют *хирургическим*. У овец, коз и свиней доступ к репродуктивному тракту при трансплантации осуществляется путем:

1) лапаротомии по белой линии живота (вентральная лапаротомия) под местной анестезией или под действием общего наркоза с промыванием рогов в положении животного лежа на спине;

2) лапаротомии в области голодной ямки с использованием специального прибора (эффеминатора) для вымывания эмбрионов в положении стоя;

3) лапароскопии – метод основан на использовании лапараскопического троактора. На фиксированном (лежа на спине) и анестезированном животном в области брюшной полости делают два небольших надреза (1,5 – 2 см): первый надрез предназначен для накачивания газовой смеси (100% - ный CO_2 , скорость нагнетания 1 л/мин, объем 2,5 - 5 литров), а второй в комплексе с первым способствует всем манипуляциям связанных с осмотром и извлечением ооцитов из фолликулов яичника гормонально индуцированных самок с применением лапараскопического троактора и канюли. При нагнетании газовой смеси важным условием является регистрация внутрибрюшинного давления, которое не должно превышать давления покоя для иглы (Veress) более чем на 5 мм ртутного столба, свидетельствуя о том, что игла правильно введена в перитонеальную полость.

Выбор метода зависит от исследователя, при этом наиболее распространенным является первый метод. Третий метод применяют для извлечения ооцитов с целью их оплодотворения *in vitro*. Данная технология используется также при пересадке эмбрионов реципиентам.

Более подробно здесь расписывается только первая методика. Трансплантация эмбрионов животных хирургическим методом при первом способе складывается из процедур, представленных в таблице 9.2.

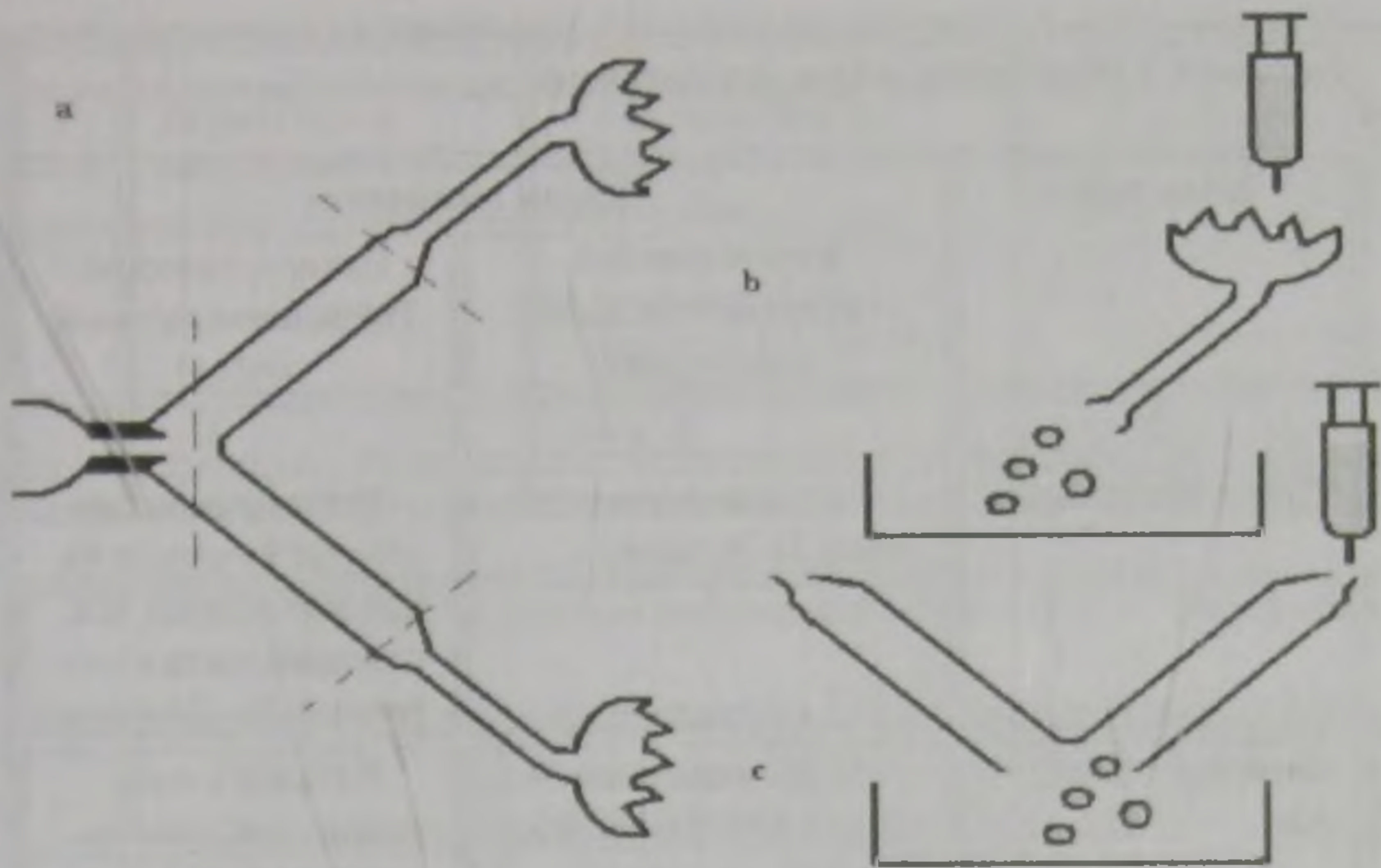


Рисунок 9.1. Вымывание эмбрионов у лабораторных животных:
 а – упрощенная схема строения гениталий самок-мышей (пунктиром обозначены места разреза); б – вымывание эмбрионов из фаллопиевых труб; с – вымывание эмбрионов из рогов матки.

После хирургического разреза методом визуальной оценки определяют на яичниках по числу желтых тел число полученных овуляций. После чего приступают к процедуре вымывания.

Используют два способа промывания гениталий с целью извлечения эмбрионов:

1) маточное, когда тупую иглу с оливой вставляют в верхушку рога матки и через нее подают шприцем промывную жидкость в направлении к бифуркации;

2) маточно-трубное, которая в свою очередь, в зависимости от направления промывной жидкости делится на два варианта:

а) извлечение эмбрионов из рога матки, т.е. когда промывную жидкость пропускают из воронки в сторону рога матки (у коров и свиней);

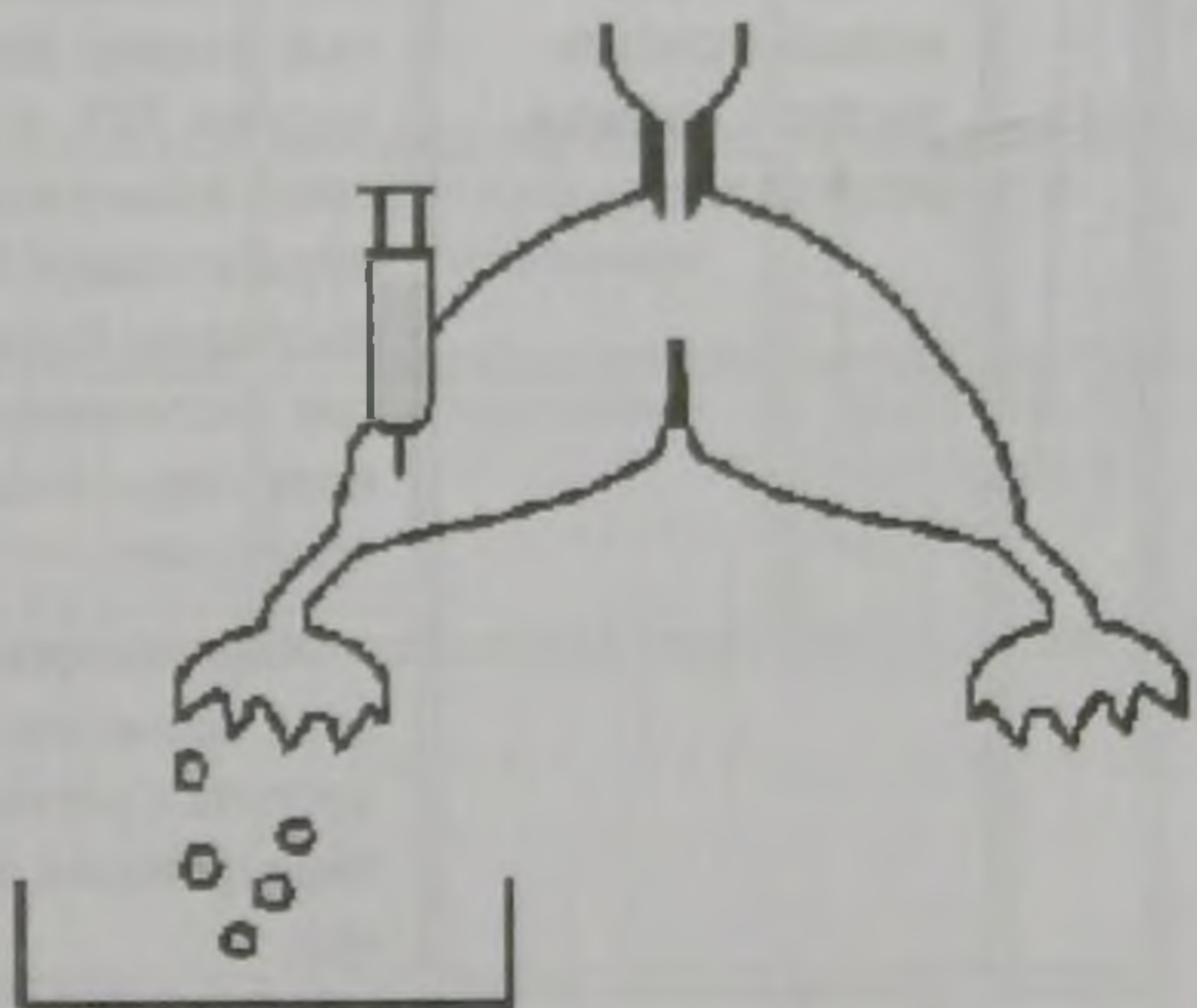


Рисунок 9.2. Упрощенная схема хирургического метода вымывания эмбрионов с использованием маточно-трубного способа извлечения.

Таблица 9.2. Вымывание эмбрионов животных

№	Этапы работ	Методы вымывания	
		Хирургический (метод вентральной лапаротомии)	Нехирургический (транспервикальный метод)
1	2	3	4
1	Подготовительный	Голодная диета в течение 24-36 часов.	Ректальное исследование яичников на наличие желтых тел; голодная диета в течение 18 - 24 часов.
2	Фиксация животных	На операционном столе в положении лежа на спине.	В станке в положении стоя; очистительная клизма.
3	Обезболивание	Общее (наркоз) или местное.	Вначале внутримышечно вводят рампуны в дозе 5 мл, а затем проводят эпидуральную анестезию (2%-ный раствор новокаина в дозе 10 - 15 мл).
4	Подготовка той части тела, через который будет осуществляться доступ к органам репродукции	<p>Операционное поле моют мыльным раствором и удаляют шерстный покров, дезинфицируют 70% -ным спиртовым раствором и обрабатывают 5%-ным раствором йода. Изоляция операционного поля хирургическим простынем.</p> <p>Хирургический разрез с целью получения доступа к рогам матки, яйцепроводам и яичникам.</p>	Наружные половые органы моют мыльным, а затем фурацилиновым раствором, дезинфицируют 2%-ным раствором диоксида.
5	Вымывание эмбрионов из гениталий	На промывание каждого рога расходуется 15 - 20 мл среды.	На промывание каждого рога расходуется 450 - 500 мл среды.

1	2	3	4
6	Период после вымывания	<p>Накладывают на брюшину и кожу кетгутовый шов.</p> <p>Животное помещают в послеоперационную секцию на 2-3 дня (при отсутствии осложнений).</p>	<p>Во влагалище (не всегда) вводят в очень малой дозе раствор антибиотиков.</p> <p>Животное содержат отдельно в течение суток (при отсутствии осложнений).</p>

Таблица 9.3. Стадия развития эмбрионов в зависимости от применяемого метода вымывания

№	Показатель	Метод вымывания эмбрионов		
		хирургический	нехирургический	после убоя
1	Видовая принадлежность	Овцематка	Корова	Лабораторная мышь
2	Время извлечения эмбрионов после последнего покрытия	Через 12 часов до 4 – 5-го дня.	С 6-го по 8-ый день.	Через 12 часов до 5-го дня.
3	Стадия развития извлекаемых эмбрионов	Зигота – ранняя морула.	Морула – бластоциста.	Зигота – бластоциста.
4	Промывная жидкость пропускается от	основания рога матки в направлении к бахромке фаллопиевой трубы	тела к рогу матки	воронки фаллопиевой трубы к рогу матки
5	Эмбрионы извлекаются из	бахромки фаллопиевой трубы	шейки матки через влагалище	рога матки
6	При пересадке эмбрионы подсаживают в	фаллопиевы трубы или основание рога матки	рог и тело матки	фаллопиевы трубы или рог матки

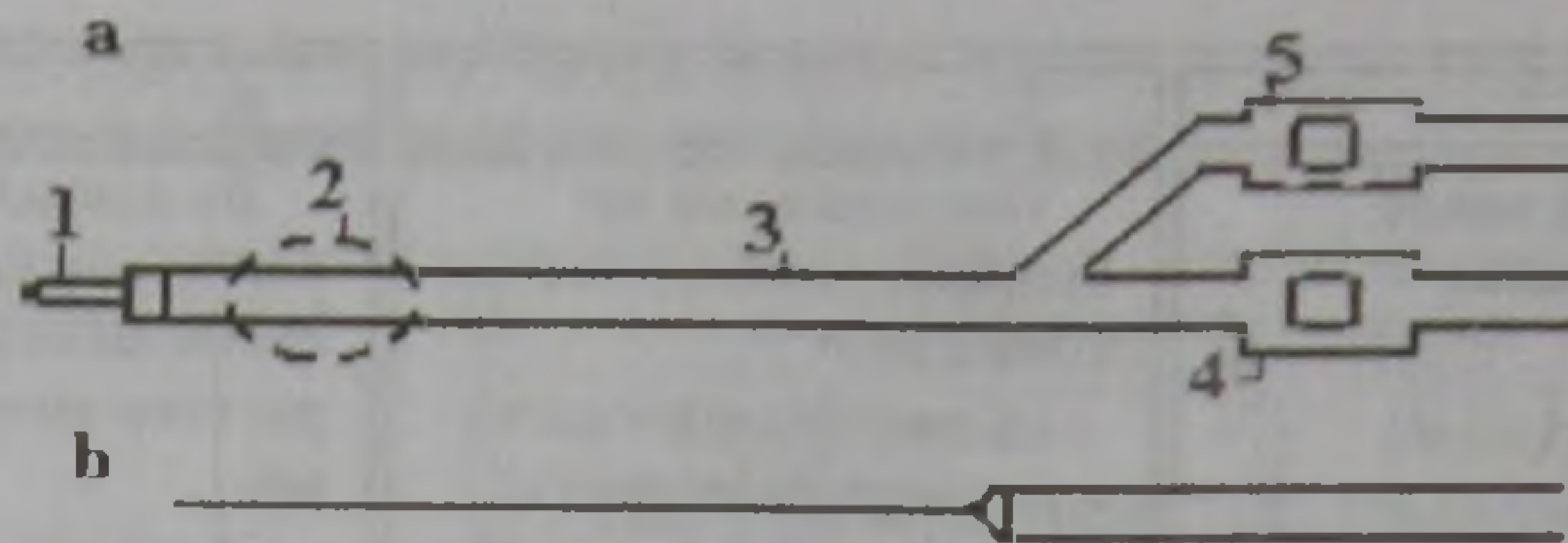


Рисунок 9.3. Катетер Ламингера для нехирургического извлечения эмбрионов: а – катетер; б – металлический стилет с ручкой; 1 – металлическая канюля; 2 – баллончик для воздуха; 3 – латексная трубка; 4 – проксимальный конец катетера; 5 – клапан для нагнетания воздуха в баллончик.

б) извлечение эмбрионов из воронки яйцевода, т.е. когда промывную жидкость пропускают от основания рога матки в сторону ампулы (у овец; рис.9.2.).

Как видно из рисунка 9.2. с каждой стороны рога матки поочередно делают прокол у основания рога матки, через который вставляют катетер и через нее подают шприцем промывную жидкость в направлении от рогов через ампулу в сторону воронки яйцевода. На промывание каждого рога матки расходуется 15 - 20 мл среды, при этом среда с эмбрионами поступает в пробирку или чашку Петри (эмбриоприемник) емкостью до 30 мл.

Хирургическое извлечение эмбрионов возможно сразу после овуляции (т.е. на следующий день после начала охоты) от стадии зиготы до стадии ранней морулы, когда эмбрионы только достигают основания рога матки. У овец эмбрионы на такой стадии развития можно извлечь с 1 по 5(6) день после начала охоты (табл.9.3.).

Метод вымывания эмбрионов, при котором осуществляется совокупность механических воздействий без нарушения целостности ткани при осуществлении доступа к гениталиям самок животных, называется *нехирургическим*. У крупных сельскохозяйственных животных (коровы) эмбрионы извлекают нехирургическим (трансцервикальным) способом при помощи специальных катетеров (рис.9.3.), которые вводят в матку со стороны влагалища (рис.9.4.).

Методика проведения нехирургического метода извлечения эмбрионов вкратце представлена в таблице 9.2.

При вымывании эмбрионов продвижение катетера в нужный рог матки происходит под ректальным контролем руки. Как только катетер продвинется на нужную глубину, в баллон нагнетают 15 - 20 мл воздуха, что необходимо для закрывания выхода из рога матки. Затем в рог вводят промывную жидкость, при этом полное извлечение эмбрионов достигается при обильном (до 500 мл раствора, нагретого до 37°C) промывании содержимого матки с одновременным массажем. Среда удаляется из рога матки порциями по 50 - 60 мл. После окончания промывания воздух из баллона удаляется и катетер извлекается.

При нехирургическом способе время извлечения эмбрионов строго лимитировано. Как было указано выше, нехирургическое извлечение возможно только из рога матки.

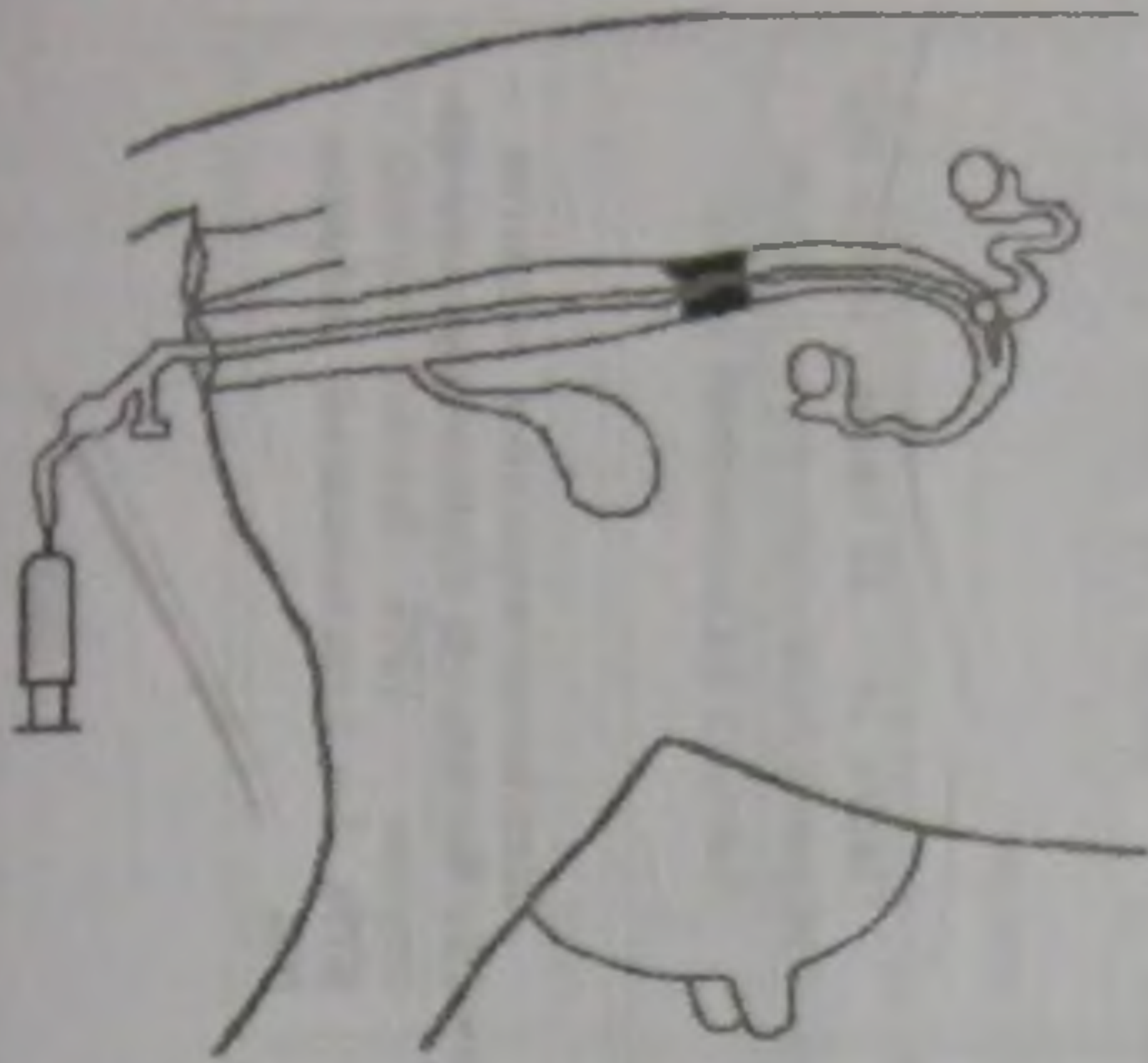


Рисунок 9.4. Упрощенная схема вымывания эмбрионов нехирургическим методом.

Следовательно, эмбрионы можно извлекать от момента их поступления в рог матки до момента имплантации в матке (более желательно до освобождения эмбрионов из прозрачной оболочки), а именно от стадии морулы до стадии экспандированной бластоцисты. У коров эмбрионы на такой стадии развития можно извлечь с 7 по 8 день после начала охоты.

Таким образом, время, за которое извлекаются эмбрионы из полового тракта доноров, зависит от применяемого метода трансплантации (табл.9.3.).

Как уже было изложено ранее (глава 1) метод трансплантации эмбрионов прочно занял свои позиции в племенном животноводстве благодаря возможностям применения различных клеточных технологий с целью "конструирования" генотипа животных на уровне эмбрионов.

В зависимости от поставленных эмбриоинженерных задач эмбрионы вымывают в такое время, чтобы получить нужное для манипулирования *in vitro* стадию развития. Поэтому при постановке эксперимента, связанных с клеточными технологиями на выбор метода вымывания эмбрионов оказывает влияние не только размер животного, но и необходимая для микроманипулирования *in vitro* стадия развития эмбриона.

Так, например, если необходимо эмбрион подвергнуть трансгенозу, то для этой цели используют зиготу на стадии двух пронуклеусов. Такую стадию развития получают при вымывании (оплодотворение *in vivo*) через 12 часов после последнего покрытия (т.е. предполагаемого оплодотворения).

Таблица 9.4. Стадия развития и биогеографическое расположение эмбрионов при их вымывании*

День индуцированного цикла	«0»	«1»	«1-2»
Биологический процесс	Охота	Суперовуляция	Оплодотворение
Причина и следствие		Насыщенный гормональный статус организма	
Физиологическая особенность репродуктивных качеств донора	У гормонально индуцированных самок-доноров период охоты удлиняется, в среднем, на 6 - 12 часов.	Начинается через 12 часов после начала охоты и продолжается в течение 24 часов. Суперовулированный фолликулогенез предполагает развитие ооцитов, находящихся на разных стадиях мейоза (от стадии метафазы I до профазы II). Благодаря насыщенному гормональному статусу и удлинению эструсу эти ооциты овулируют в разное время. Поэтому полиовуляционная реакция в яичниках протекает примерно 10 - 24 часа.	Начинается через 2 часа после овуляции и продолжается 24 - 36 часов. Оплодотворение происходит в ампуле фаллопиевой трубы
Время вымывания зигот	.	Через 12 часов после последнего покрытия.	Через 24 - 36 часов после последнего покрытия.
Биогеографическое расположение	.	Яичники (для не овулированных ооцитов) - ампула фаллопиевой трубы (для овулированных ооцитов).	Ампула фаллопиевой трубы
Популяция получаемых при вымывании ооцитов и зигот	.	Неоплодотворенных ооцитов - 10%. Зиготы на стадии двух пронуклеусов - 80%. Зрелые зиготы - 10%	Неоплодотворенных ооцитов - 1%. Зиготы на стадии двух пронуклеусов - 10%. Зрелые зиготы - 80%. 2-х blastomерный эмбрион - 9%.

Продолжение таблицы 9.4. Стадия развития и биогеографическое расположение эмбрионов при их вымывании (в среднем для лабораторных и сельскохозяйственных животных)				
День	«2-3»	«4»	«5»	
Биологический процесс	Предимплантационное развитие эмбрионов. При вымывании эмбрионы находятся на разных стадиях дробления			
Физиологическая особенность репродуктивных качеств донора	Насыщенный гормональный статус организма			
Время вымывания эмбрионов	Через 48-60 часов после последнего покрытия.	Через 84 часов после последнего покрытия.	Через 118 часов после последнего покрытия.	
Биогеографическое расположение	Ампула - истмус фаллопиевой трубы.	Ампуло-истмическое и маточно-трубное соединения.	Маточно-трубное соединение и основание рога матки.	
Популяция получаемых при вымывании эмбрионов	Зигота - 5%. 2-х бластомерный эмбрион - 65%. 4-х бластомерный эмбрион - 20%. 6-8-ми бластомерный эмбрион - 10%.	2-х бластомерный эмбрион - 5%. 4-х бластомерный эмбрион - 15%. 6-8-ми бластомерный эмбрион - 60%. Ранняя морула - 20%.	6-8-ми бластомерные эмбрионы - 10%. Ранняя морула - 40%. Морула - 40%. Бластоциста - 10%.	

Продолжение таблицы 9.4. Стадия развития и биогеографическое расположение эмбрионов при их вымывании (в среднем для лабораторных и сельскохозяйственных животных)

День	«6»	«7»	«8»
Биологический процесс	Предимплантационное развитие эмбрионов. При вымывании эмбрионы находятся на разных стадиях дробления		
Физиологическая особенность репродуктивных качеств донора	Насыщенный гормональный статус организма		
Время вымывания эмбрионов	Через 132 часа после последнего покрытия.	Через 162 часа после последнего покрытия.	Через 186 часов после последнего покрытия.
Биогеографическое расположение	Основание рога матки.	Рог матки.	Рог матки.
Популяция получаемых при вымывании эмбрионов	Морула – 70%. Бластоциста – 30%.	Морула – 40%. Бластоциста – 60%.	Морула – 10%. Бластоциста – 90%.
* - сведения даны по средним данным у овец и коров.			

В данном случае применение у коров нехирургического метода вымывания эмбрионов просто недопустимо в связи с тем, что зигота на стадии двух пронуклеусов "географически" развивается в ампуле фаллопиевой трубы (табл. 9.4.). Поэтому выбор метода вымывания определяется следующими факторами: 1) видовая принадлежность; 2) размер животного; 3) необходимая стадия развития предимплантационного эмбриона, что важно для клеточных технологий.

9.2. Выход эмбрионов от суперовулированных доноров

После определения на яичниках донора путем подсчета желтых тел уровня суперовуляции приступают к процессу извлечения эмбрионов методом вымывания.

Продукцию, которую получают при вымывании эмбрионов из гениталий доноров, называют биотехнологическим материалом (биоматериал). Биоматериал имеет следующие особенности:

1. Жидкой основой для биоматериала служит питательная среда.
2. Биоматериал разнороден по качеству.
3. Состав биоматериала зависит от времени, когда производят вымывание эмбрионов:

3.1. При хирургическом методе, когда эмбрионы обычно вымывают в первые два дня после последнего покрытия донора, в составе биоматериала Вы можете обнаружить: 1) биологически полноценные эмбрионы; 2) биологически неполноценные эмбрионы; 3) неоплодотворенные ооциты; 4) сперматозоиды.

3.2. При нехирургическом методе, когда эмбрионы вымывают через 5 – 7 дней после последнего покрытия доноров, в составе биоматериала обнаруживаются: 1) биологически полноценные эмбрионы; 2) биологически неполноценные эмбрионы.

После вымывания биоматериал обязательно подвергается изучению и анализу.

При изучении биоматериала особое внимание уделяется эмбрионам и ооцитам (сперматозоиды из поля зрения исключаются). Последовательность изучения биоматериала следующая:

- 1) определяют общее число полученных эмбрионов и неоплодотворенных ооцитов с вычислением их процентного соотношения;
- 2) из общего числа эмбрионов (100%) подсчитывают число биологически полноценных ($x, \%$) и неполноценных ($y, \%$) эмбрионов;
- 3) определяют стадию развития эмбрионов как полноценных, так и неполноценных;
- 4) анализируют полученные сведения путем применения методов количественной биологии;
- 5) определяют потери и выявляют различные факторы, которые способствовали процессам дегенерации для биологически неполноценных эмбрионов;
- б) изучают взаимозависимость между суперовулированными ооцитами, извлеченным биоматериалом и полученными после оценки биологически полноценных эмбрионов.

Требования, предъявляемые к изучению биоматериала:

1. Биоматериал подвергается изучению сразу после вымывания в течение 15 - 20 минут. Ни в коем случае нельзя оставлять биоматериал для исследования на более поздние сроки.

2. Состав биоматериала изучается для правого и левого яйцепроводов по отдельности.

Как уже было отмечено ранее (глава 8) на вымываемость биоматериала влияют, прежде всего, профессиональные качества специалиста. Поэтому этот этап работы необходимо проводить на высоком профессиональном уровне.

Таким образом, при вымывании биоматериала Вы особое внимание уделяете биологически полноценным эмбрионам. Поэтому обязательно определяете такой показатель, как вымываемость эмбрионов. *Вымываемость эмбрионов* – это показатель, указывающий на выход биологически полноценных эмбрионов от числа полученных овуляций.

9.3. Пересадка эмбрионов

Пересадку эмбрионов осуществляют в репродуктивный тракт самки-реципиента. При этом различают два метода пересадки эмбрионов: хирургический (лабораторные животные, овцы, свиньи) и нехирургический (коровы). Последовательность проведения работ при пересадке идентичны с методикой, расписанной в таблице 9.2. для вымывания. Исключением является 5 пункт таблицы, где вместо вымывания выполняют процедуру пересадки эмбрионов.

При пересадке реципиентам необходимо пересаживать эмбрионы непосредственно в *ипсилатеральную* сторону яичника (у свиней из-за способности эмбрионов мигрировать и распределяться по двум рогам самостоятельно, этот фактор можно не учитывать). *Ипсилатеральной* считается та сторона яичника, в которой произошла овуляция.

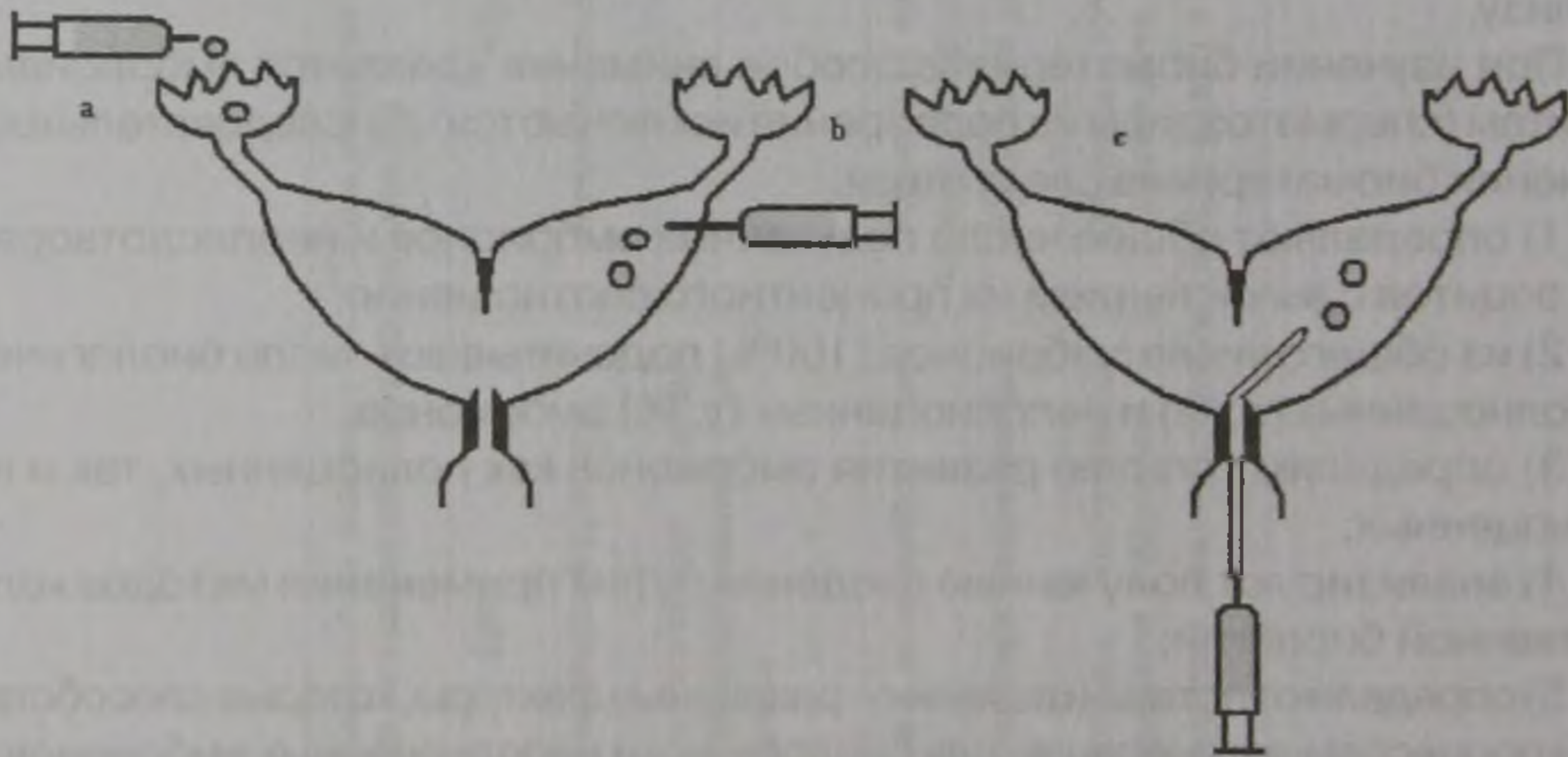


Рисунок 9.5. Упрощенная схема пересадки эмбрионов.

а) хирургический метод пересадки в воронку фаллопиевой трубы; б) хирургический метод пересадки в рог матки; в) нехирургический метод пересадки эмбрионов через цервикальный канал в рог матки.

При хирургическом способе эмбрионы пересаживают, в зависимости от стадии их развития, в яйцевод, рог и тело матки, а при нехирургическом способе – в рог или тело матки. При этом пересадка эмбрионов в самку – реципиент осуществляется в следующей последовательности (рис. 9.5, а, б): вначале определяют ипсилатеральную сторону фаллопиевой трубы или рога матки по наличию желтого тела на яичнике, затем подсаживают эмбрионы. При хирургическом методе эмбрионы вводят в яйцевод через воронку или рог матки посредством прокола, который производят с помощью специальных игл с тупым концом. Для пересадки эмбрионов используют гибкий тифлоновый катетер, который присоединяется к шприцу объемом 1 - 5 мл.

При нехирургическом способе пересадка эмбрионов осуществляется в следующей последовательности (рис 9.5, с): вначале в матку реципиента вдувают углекислый газ, затем пайету с эмбрионами помещают в катетер Кассу и далее под ректальным контролем руки катетер проводят через шейку в рог матки на расстояние 5 - 7 см от тела матки. После чего нажимают на шток катетера и содержимое пайеты, вместе с эмбрионами выдавливается в рог матки.

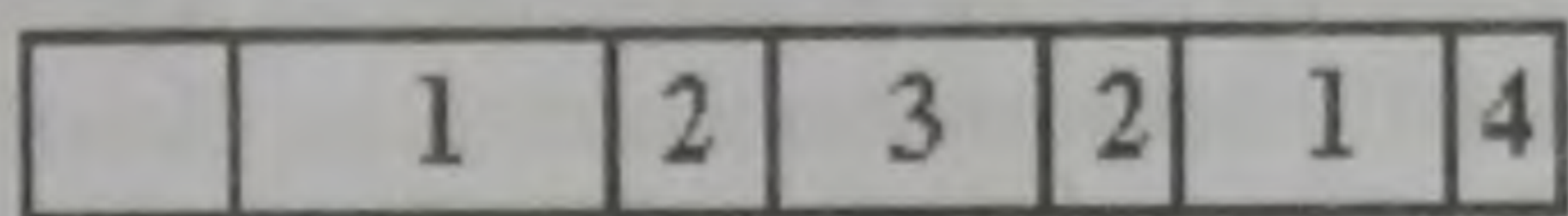


Рисунок 9.6. Схема заполнения пайеты (1 – среда; 2 – воздух; 3 – среда с эмбрионами; 4 – пробка пайеты).

го развивающимся желтым телом, способствует снижению мышечных сокращений матки, что оказывает благоприятное воздействие на приживляемость эмбриона при трансплантации.

Для проведения пересадки нехирургическим способом используют инструменты, которые аналогичны инструментам, применяемых при искусственном осеменении (рис 9.6.): в пайету набирают питательную среду (1,0 - 1,5 см), затем пузырь воздуха (0,5 см) и далее под контролем микроскопа основной объем среды с эмбрионом (2 – 3 см), после этого нагнетают немного воздуха (0,5 см) и питательную среду (1 - 1,5 см). При введении катетера в рог матки для предотвращения механического раздражения необходимо избегать чрезмерно медленного и слишком быстрого его введения.

Теоретически беременность после пересадки жизнеспособных эмбрионов должна достигать 100%. В практике же, из-за гибели предимплантационных эмбрионов в матке реципиента, этот показатель ниже теоретически ожидаемого.

Успех трансплантации, главным образом, зависит от физиологического, биохимического и иммунологического взаимодействия между донором, эмбрионом и реципиентом. Гибель эмбриона после пересадки его в генитальный аппарат реципиента – это результат неустановленного физиолого-биохимичес-

При нехирургическом методе манипуляции, связанные с пересадкой эмбрионов, нельзя проводить на ранних стадиях развития желтого тела, то есть ранее 4 - 5-го дня после овуляции, т.к. увеличение концентрации прогестерона, вырабатываемого

кого «диалога» между эмбрионом и маткой реципиента. Поэтому, для успешной имплантации зародышей необходимо учитывать следующие факторы:

1. Хромосомные аномалии эмбрионов. По King W. (1985) более половины эмбрионов в день извлечения от доноров имеют хромосомные аномалии. Отбор доноров по данному признаку способствует снижению смертности предимплантационных эмбрионов. Кроме того, на появление хромосомных аномалий до пересадки эмбрионов влияют манипуляции с ними в условиях *in vitro*.

2. Слабость сигнала трофобласта (трофическая экто- и эндодерма) эмбриона при имплантации. Жизнеспособные эмбрионы подают сигнал матке реципиента на продление фазы желтого тела полового цикла и превращение его в фазу желтого тела беременности.

3. Белки беременности, которые вырабатываются зародышем и плацентой, проявляющиеся в сыворотке крови матери.

4. Иммунологическая перестройка в организме реципиента.

5. Эндокринные факторы. Как известно, беременность предопределяется гормональной перестройкой, которая ведет к изменению секретной функции и структуры слизистой оболочки матки (прогестерон, эстрогены). Особая роль при этом принадлежит гормону прогестерон. Поэтому пересадка эмбрионов на более поздних стадиях (морула, бластоциста) предполагает их ввод в матку (нехирургический метод), которая благодаря прогестерону более подготовлена к процессу имплантации, чем при пересадке эмбрионов на более ранних стадиях развития (зигота – 16-ти бластомерные).

6. Сосудистая реакция матки на месте прикрепления эмбрионов. В этот период в матке и яичниках происходит кратковременное повышение интенсивности кровообращения, которая способствует снижению сократительной активности артерий матки, что необходимо в «критический период распознавания» эмбриона и его успешной имплантации.

Пересаживая эмбрионы в гениталии реципиентов необходимо соблюдать следующие правила:

1. Пересаживать эмбрионы следует самкам - реципиентам, имеющей с самкой - донором синхронное проявление охоты. Благодаря этому экспериментатор при пересадке соблюдает синхронность между стадией развития матки реципиента и стадией развития пересаживаемых эмбрионов. В таблице 9.5. приводятся усредненные сведения, указывающие на развитие предимплантационных эмбрионов при их перемещении по репродуктивному тракту у коров и овец. Поэтому при пересадке желательно придерживаться «биологических инструкций» для обеспечения полноценного предимплантационного развития пересаженных в гениталии самок-реципиентов эмбрионов.

Но следует при этом учитывать тот фактор, что у суперовулированной самки - донора гормональный статус организма повышен и, в результате

Таблица 9.5. Физиологическое взаимодействие между эмбрионом и реципиентом у коров и овец (показатели усреднены)

№	День полового цикла донора	Стадия развития эмбриона	Благоприятное "биогеографическое расположение" эмбриона в гениталиях
1	День "0" цикла	Проявление у самки охоты	Третичный фолликул яичника
2	Первый день цикла	Овуляция	Ооцит через бахромку поступает в ампулу фаллопиевой трубы
3	Через 12 часов после начала оплодотворения	Зигота на стадии двух пронуклеусов	Ампула фаллопиевой трубы
4	Второй день цикла	Зрелая зигота	Ампуло-истмическое соединение фаллопиевой трубы
6	Третий день цикла	2-х бластомерный эмбрион	Истмус фаллопиевой трубы
7	Четвертый – шестой дни цикла	Ранние стадии дробления (2-16-ти бластомерные)	Маточно-трубное соединение фаллопиевой трубы
8	Седьмой день цикла	Ранняя морула	Основание рога матки
9	Восьмой день цикла	Морула и бластоциста	Рог матки

"биологические часы" для эмбрионов работают в "ускоренном темпе". Данное ускорение в темпе развития (по научным данным) составляет 3 – 6%.

2. Для пересадки используют только биологически полноценные эмбрионы.

3. При пересадке эмбрионы подсаживают на ипсилатеральную сторону яйцепровода и рога матки.

4. Число пересаживаемых эмбрионов зависит от видовой принадлежности животных. При этом в гениталии реципиента для одноплодных животных подсаживают по 2 (реже по 3), а для многоплодных по 1,5 - 2 эмбриона на одно "потенциальное место" матки, так как это обеспечивает увеличение вероятности имплантации для пересаживаемых эмбрионов.

5. В животноводстве с целью изучения влияния материнского эффекта на рост и развитие трансплантата желательно использовать межпородную трансплантацию эмбрионов (но не всегда).

При этом предпосылками для успешной имплантации трансплантируемых эмбрионов являются:

1. Синхронность между стадией развития матки и стадией развития эмбриона. Установлено, что между стадиями развития матки (следовательно, и желтого тела) и пересаживаемых эмбрионов должна быть "тесная взаимосвязь".

2. Правильная и безошибочная оценка эмбрионов по качеству.

Таблица 9.6. Приживляемость эмбрионов в зависимости от метода пересадки

№	Показатель	Метод пересадки эмбрионов	
		Хирургический	Нехирургический
1	Стадия развития эмбриона*	Зигота – ранние стадии дробления	Морула – бластоциста
2	Биогеографическое место для подсадки**	Истмус – основание рога матки	Рог матки
3	Процент приживляемости***	До 35%	До 60%

* - хирургический метод не исключает пересадку морул и бластоцист, так как для животных мелкого размера применим только метод лапаротомии;
 ** - это место в репродуктивном тракте, куда подсаживаются эмбрионы;
 *** - даны усредненные показатели без учета видовой принадлежности животных.

3. Пересадка эмбрионов при нехирургическом методе – на стадиях морулы и бластоцисты, а при хирургическом – зиготы и ранних стадий дробления. Установлено, что при пересадке эмбрионов на более поздних стадиях развития при нехирургическом методе способствует более высокому проценту приживляемости по сравнению с эмбрионами, которые были пересажены на более ранних стадиях дробления. При хирургическом методе на приживляемость эмбрионов влияет их стадия развития и место подсадки (биогеографическое расположение). А это свидетельствует о том, что чем старше “по возрасту” желтое тело беременности, тем более подготовлена матка к принятию “чужого” эмбриона. Хотя это предположение все еще остается под вопросом, так как имеются противоречивые сведения. Во-первых, имеются работы, где процент приживляемости более высок для эмбрионов, которые были пересажены на стадии зиготы, 2-х и 4-х бластомер (при хирургическом методе) по сравнению с эмбрионами, пересаженные на стадии морулы и бластоцисты (при нехирургическом методе; 48% против 35%). Во-вторых, при оценке эмбрионов по качеству процентный выход дегенерированных эмбрионов более высок для стадии морулы и бластоцисты по сравнению с эмбрионами, находящихся на ранних стадиях развития. Быть может, поэтому при пересадке эмбрионов на более поздних стадиях развития (при нехирургическом методе) происходит более высокая приживляемость по сравнению с эмбрионами, находящихся на ранних стадиях развития (при хирургическом методе пересадке; табл.9.6.).

9.4. Взаимодействие между донором, эмбрионом, реципиентом и трансплантатом

Успех в биотехнологии воспроизводства зависит от успешной имплантации пересаженных эмбрионов в матке реципиента и рождению, в дальнейшем, трансплантатов.

При пересадке эмбрионов реципиентам необходимо провести следующие обязательные мероприятия:

1. В день операции, когда реципиентам подсаживают эмбрионы, проводят запись первичных сведений в журнале учета, в котором фиксируются следующие

сведения: дата операции, индивидуальный номер, породная принадлежность и возраст биологической матери, стадия и число пересаживаемых эмбрионов, место подсадки (ипсилатеральная сторона и биогеографическое расположение).

2. В течение 2 – 3 дней (при отсутствии осложнений) реципиенты содержатся в отдельных помещениях.

3. Для выявления беременности за реципиентами наблюдают в течение 1-го – 2-х половых циклов. Если у самки-реципиента не наблюдается за этот период повторной охоты, то она считается беременной. Кроме того, можно использовать биохимические методы анализа на наличие в крови у самок - реципиентов гормонов беременности.

Данные мероприятия предполагают проведение следующих исследований связанных с изучением физиологической взаимозависимости между донором, эмбрионом, реципиентом и трансплантатом:

1. Определение процента суягности в зависимости от:

- 1) числа использованных для пересадки реципиентов;
- 2) породной принадлежности самок-доноров и самок-реципиентов;
- 3) физиологической взаимозависимости между самками-донорами и самками-реципиентами (синхронность).

2. Определение процента приживляемости пересаженных эмбрионов в зависимости от:

- 1) числа использованных для трансплантации эмбрионов;
- 2) стадии развития эмбрионов;
- 3) срока службы самок-доноров и самок-реципиентов;
- 4) физиологической взаимосвязи между стадией развития эмбрионов и стадией развития матки реципиента.

Приживляемость эмбрионов – это относительный показатель, указывающий на имплантацию эмбрионов в матке реципиентов в зависимости от общего числа их использования.

3. Определение и выявление факторов, влияющих на приживляемость трансплантируемых эмбрионов в зависимости от:

- 1) породной принадлежности самки - донора и самки - реципиента;
- 2) возраста самки - донора и самки - реципиента;
- 3) сезона размножения;
- 4) стадии развития пересаженных эмбрионов;
- 5) физиологического критерия взаимосвязи между донором и реципиентом.

4. Изучение влияния материнского эффекта на рост и развитие полученных трансплантатов, для чего необходимо:

· во-первых, изучить результаты рождения в зависимости от:

- 1) синхронности эстральных циклов между донорами и реципиентами;
- 2) стадии развития пересаженных эмбрионов;
- 3) числа трансплантируемых эмбрионов;
- 4) породных и возрастных сочетаний донора и реципиента и,

· во-вторых, изучить влияние материнского эффекта на рост, развитие и формирование продуктивных качеств трансплантатов в постнатальный период их развития.

9.5. Научно-исследовательская работа кафедры “Селекция и биотехнология животных” КАЗНАУ

Как известно, в Казахстане в последнее десятилетие произошло резкое снижение поголовья особенно высокопродуктивных племенных овец, что связано, прежде всего, с экономическими катаклизмами периода перестройки. Поэтому наиболее актуальным в настоящее время является увеличение поголовья овец, имеющих ценный генотип. На сегодня метод ускоренного размножения ценных генотипов овец путем трансплантации эмбрионов является наиболее важной задачей в увеличении поголовья овец.

В связи с этим на кафедре селекции и биотехнологии животных сотрудниками лаборатории «Биотехнология животных» КазНАУ под руководством профессора Садыкулова Т.С. и координатором профессора Касымова К.Т. с 1997 года проводятся работы по трансплантации эмбрионов овец в племенном частном хозяйстве «Мади» Жамбылского района Алматинской области (частный предприниматель Касенов Т.).

Таблица 9.7. Показатели продуктивных качеств баранов - производителей, овцематок - доноров и овцематок - реципиентов (Садыкулов Т.С., Джамалова Г.А., Касымов К.Т., Буралхиев Б.А., 2002-2003 гг.)

№	Группа овец	Генотип	n	$X \pm m_x$, кг	C_v
Живая масса, кг					
1	Баран-производитель	ДПТ	1	103	-
		ДПГ	1	104	-
2	Овцематка-донор	ДПТ	5	$68,6 \pm 1,1$	6
		ДПГ	4	$66,5 \pm 0,1$	4
3	Овцематка-реципиент	Помесь ДПТ x КТ	19	$51,2 \pm 0,2$	13
Настриг шерсти, кг					
1	Баран-производитель	ДПТ	1	6,7	-
		ДПГ	1	5,3	-
2	Овцематка-донор	ДПТ	5	$4,5 \pm 1,14$	4
		ДПГ	4	$4,3 \pm 0,6$	8
3	Овцематка-реципиент	Помесь ДПТ x КТ	19	$3,1 \pm 0,4$	16
Длина шерсти, см					
1	Баран-производитель	ДПТ	1	14,7	-
		ДПГ	1	12/16	-
2	Овцематка-донор	ДПТ	5	$12,3 \pm 1,14$	4
		ДПГ	4	$10/14 \pm 0,11$	4
3	Овцематка-реципиент	Помесь ДПТ x КТ	19	$7,3 \pm 0,4$	14

В данном хозяйстве бараны-производители и овцематки-доноры дегересской курдючной породы используются как селекционный материал для ускоренного размножения ценных генотипов методами биотехнологии воспроизводства. Новизна исследований определяется тем, что впервые работы по трансплантации эмбрионов проводятся на дегересских овцах с полутонкой и полугрубой шерстью.

В качестве овцематок - доноров и баранов - производителей используются наиболее высокопродуктивные по стаде овцы дегересской породы, превосходящие минимальные требования стандарта породы, установленные для овец с полугрубой шерстью (ДПГ) класса элита по живой массе и настригу шерсти на 15 и 32%, а с полутонкорунной шерстью (ДПТ) – на 14 и 21% соответственно и по длине полутонкой шерсти на 14%; для овцематок-доноров этих генотипов превосходство, в среднем, отмечается на 15, 32 и 14, 21, 14% соответственно. А в качестве реципиентов используются низкопродуктивные помесные матки (ДПТ x КТ; табл.9.7.).

В таблице представлены сведения о животных, от которых были получены ягнята-трансплантаты за период с 2002 - 2003 годы. Следует отметить, что количество использованных осенью реципиентов для пересадки эмбрионов больше по сравнению с реципиентами, от которых были получены ягнята-трансплантаты. Так, в течение двух лет при трансплантации были использованы 33 реципиента, из которых окотилось только 19 (8 в 2002 и 11 в 2003 гг.).

В таблице 9.7 приводятся данные по 19 реципиентам, что основано на изучение взаимосвязи между биологической (мать - донор) и физиологической (мать - реципиент) матерью. Таким образом, на этом этапе учитываются параметры взаимосвязи между производителями, донорами (биологические родители) и реципиентами (физиологическая мать) по полученному приплоду за два года.

На одного суперовулированного донора дегересской породы используется, в среднем, 3,0 - 3,7 реципиентов. Только за 2003 год из 33 реципиентов окотилось 19 (57%), что из расчета на донора составило 2,1, в том числе 11 реципиентов в 2003 году окотились ягнятами ДПТ (2,2 на донора) и 8 реципиентов в 2002 году – ягнятами ДПГ (2,0 на донора). От 19 окотившихся реципиентов получено 20 ягнят-трансплантатов (30% от числа пересаженных эмбрионов), что из расчета на донора составило 2,2, из которых 12 ягнят ДПТ родились в 2003 году (2,4 на донора) и 8 ягнят ДПГ в 2002 году (2,0 на донора). В зависимости от пола рождено 8 баранчиков (3 гол. в 2002; 5 гол. в 2003 годы) и 12 ярочек (5 гол. в 2002 и 7 гол. в 2003 годы).

При дальнейших работах сотрудниками данной лаборатории планируется увеличить рождение ягнят-трансплантатов из расчета на донора с 2,4 до 3,0 - 3,2, что позволит увеличить в расчете на одну матку – донор от молодняка трансплантатов (баранчики и ярочки) в возрасте 4,5-5 мес. производство молодой ягнятины с живой массой 92,8 – 108,8 кг, против 29– 34 кг, чем при обычном методе, а в 12-месячном возрасте соответственно 131 – 170 кг против 41–53 кг, а производство шерсти в расчете на одну матку- донор от молодняка- трансплантата (баранчики и ярочки) составит 8 – 11,2 кг против 2,7-3,5 кг, чем при обычном методе.

При проведении работ, связанных с биотехнологией трансплантации эмбрионов сотрудниками лаборатории за этот период изучалось влияние материнского эффекта на формирование хозяйственно-полезных селекционируемых признаков у овец - трансплантатов. Данный анализ позволит, в будущем, координировать биологический процесс для трансплантата таким образом, чтобы обеспечить для селекционной работы успех в ускоренном размножении ценных генотипов дегересских овец. Не следует забывать, что при трансплантации эмбрионов на процесс формирования биологических и селекционных признаков на трансплантата оказывает влияние не только биологические родители (баран - производитель и овцематка - донор), которые обеспечивают передачу ценного генотипа, но и физиологическая мать (овцематка - реципиент), которая обеспечивает для трансплантата, во - первых, естественную инкубационную среду в пренатальный период развития и, во - вторых, благоприятные условия для роста и развития рожденных трансплантатов в молочный период постнатального развития. Поэтому в комплексе биологические родители и физиологическая мать определяют селекционный успех в ускоренном разведении ценных потомков.

День полового цикла	Методика гормональной обработки	
	Овцематки-доноры ДПГ (5 гол), 2001г	Овцематки-доноры ДПГ (5 гол), 2002 г.
	I	II
0	-	Пессарии
12	ГСЖК в дозе 1800 ИЕ (производство Израиль)	ГСЖК 1500 ИЕ (производство Голландия)
14	Эстрофан в дозе 0,25 мг	Эстрофан в дозе 0,25 мг
16 - 17	Выявление охоты, осеменение	
18-20	Вымывание эмбрионов и пересадка их в гениталии реципиентов	

Поэтому при изучении роста и развития овец - трансплантатов, полученных за период с 2002 - 2003 годы, перед нами была поставлена цель, проанализировать биологическую взаимосвязь между баранами-производителями, овцематками-донорами, трансплантируемыми эмбрионами, овцематками - реципиентами и рожденными от них ягнятами - трансплантатами, которые выражаются через раскрытие физиологических и биохимических факторов этой сложной связи. Данный анализ необходим для того, чтобы выявить как преимущества, так и недостатки, просчеты проводимых исследований по ускоренному размножению ценных генотипов овец дегересской породы. В процессе данной работы перед сотрудниками стоит задача совершенствования таких методов, как суперовуляция и хирургический метод трансплантации эмбрионов.

Как видно из таблицы 9.7, всего для трансплантации отобрано за данный этап 10 овцематок – доноров, из них 5 – к первой и 5 – ко второй серии опытов. В целом, в нашей работе доноры, в зависимости от гормональной обработки, были разделены на 2 группы: в первую группу вошли доноры ДПГ (5 гол., 2001г.), во вторую – доноры ДПТ (5 гол., 2002г., табл.9.8.).

№	Показатель	Группа доноров		Всего
		I	II	
1	Породная принадлежность	ДПГ	ДПТ	ДЕГ
2	Обработано доноров, п	5	5	10
3	Из них (п - %):	4 (80%)	5 (100%)	9 (90%)
4	Число овуляций: п на донора C_v	46	41	87
		$9,2 \pm 2,6$	$8,2 \pm 0,9$	$8,7 \pm 0,6$
		17	14	21
5	Извлечено эмбрионов: п на донора: C_v	42	37	79
		$8,4 \pm 1,0$	$7,4 \pm 0,6$	$7,9 \pm 1,8$
		15	10	18
6	Биополноценных эмбрионов: п на донора: C_v	36	30	66
		$7,2 \pm 1,5$	$6,0 \pm 0,4$	$6,6 \pm 2,3$
		16	10	18

Известно, что важным звеном метода трансплантации является стимуляция множественной овуляции, так как реакция яичников на гонадотропин у овец имеет высокую вариабельность, потому что она зависит как от эндогенных (происхождение, порода, возраст), так и от экзогенных (схема и доза обработки, стадия эстрального цикла) факторов. Для вызывания суперовуляции обработка овцематок-доноров проводилась в случной период по двум схемам: для первой группы использовались вагинальные пессарии, для второй – пессарии не использовались. Схема гормональной обработки представлена в таблице 9.8.

Осеменяли овцематок – доноров бараном – производителем двукратно с интервалом 10 - 12 часов.

В зависимости от применяемых методик лучшая реакция яичников у овцематок – доноров наблюдалась по второй методике (100%; табл.9.8.1.). Всего же за два года, число овуляций на донора составило 8,7; при этом получено полноценных эмбрионов в расчете на донора 6,6. Потери при вымывании и оценке составили – 25%.

По полученным результатам можно заключить, что первая методика по гормональной обработке требует доработки. Высокая доза гормонального препарата в этом случае привела, во-первых, к полному игнорированию на вводимые гормоны яичниками у одной овцематки; во-вторых, что будет отражено ниже, к низкому проценту приживляемости трансплантируемых эмбрионов.

9.5.1. Влияние стадии развития эмбрионов на их приживляемость в гениталиях у овцематок-реципиентов при межпородной трансплантации за 2002-2003 годы

Главным фактором, определяющим результативность трансплантации эмбрионов, является их качество. В наших исследованиях качество предимплантационных эмбрионов определяли по визуальным морфологическим признакам, по соответствию стадии развития фактическому возрасту эмбрионов.

Таблица 9.9. Стадия развития предимплантационных эмбрионов (Садыкулов Т.С., Джамалова Г.А., Касымов К.Т., Буралхиев Б.А., 2002-2003 гг.)

№	Стадия развития	Группа маток - доноров				Всего	
		I - ДПГ		II - ДПТ			
		п	%	п	%	п	%
1	Зигота 4-х - бластомерный	26	39	23	34	49	74
2	8 - 16 - бластомерный	10	15	7	12	17	26
	Всего	36	54	30	46	66	100

По показателям таблицы 9.9 видно, что из 79 извлеченных эмбрионов (7,9 на донора) 83% были биологически полноценными (66 эмбриона) и получено из расчета на донора в зависимости от их генотипа: 7,2 по ДПГ и 6,0 по ДПТ овцематкам.

Из 66 биологически полноценных эмбрионов, в зависимости от стадии их развития, нами получено: от первой группы маток – ДПГ 39% на стадии зигот и эмбрионов на стадиях двух-четырёх бластомер и 15% - на стадии 8 - 16 бластомер, а от второй группы маток – ДПТ 34% и 12% - соответственно (табл.9.9.).

Таблица 9.10. Стадия и место развития эмбриона в гениталиях овцематки - донора (Садыкулов Т.С., Джамалова Г.А., Касымов К.Т., Буралхиев Б.А., 2002-2003 гг.)

Показатель	День цикла		Место развития эмбриона
	биологическое	стимулированное	
Половой цикл, продолжительность по фазам:	16-18 дней	16-18 дней	
- фолликулярной	2 - 3	2 - 3	
- лютеальной	14 - 15	14 - 15	
Течка	15-16	-	
Охота, осеменение	16-17	0	
Овуляция, оплодотворение	17-18	1	

Показатель	День цикла		Место развития эмбриона
	биологическое	стимулированное	
2-х бластомерный эмбрион		3*	
4 - 8 бластомерный эмбрион		4*	
8 - 16 бластомерный эмбрион		5	
Морула		6	Рог матки
* - день вымывания эмбрионов			

Согласно литературным источникам можно извлечь на «день 2» эмбрионы на стадиях зиготы и 2-х бластомер; на «день 3» - 2-х бластомерных и «день 4» - 4 - 8-ми бластомерных. Нами же были извлечены эмбрионы от стадии зиготы до 4-х бластомер в «день 2» и от 4-х бластомер до ранних морул в «день 3 и 4». Как видим, и в первых и во вторых сериях эксперимента наблюдается для одних опережение сроков предимплантационного развития эмбрионов примерно на 24 – 36 часов от биологически запрограммированного, для других - нет. Возможно, объяснение этому следует искать, во - первых, в пресыщенности гормонального «статуса» организма овцематок - доноров подвергших инъекции извне и, во вторых, не следует забывать, что самки - доноры осеменялись двукратно с интервалом 10 - 12 часов, поэтому, возможно извлечение «разнокачественных» по стадиям развития эмбрионов (табл.9.10.). Детальное изучение этого вопроса мы планируем продолжить в следующих работах, которые запланированы нами в следующем году.

9.5.2. Взаимозависимость между донором, эмбрионом, реципиентом и трансплантатом

При работе нами была поставлена цель, проанализировать различные параметры, объединяющие донора, эмбрион и реципиента, а также выделить основные факторы, которые способствовали бы повышению суягности при пересадке эмбрионов методом лапаротомии (табл. 9.11.).

При этом необходимо отметить, что 66 эмбрионов из 79, полученных при заказном спаривании у овец дегересской породы были пересажены в гени- талии 33 реципиентов.

По данным таблицы 9.11. видно, что процент суягности высок для доно- ров дегересской породы при трансплантации зигот, 2-х и 4-х бластомерных эмбрионов, а самый низкий процент суягности получен при трансплантации 8-16 бластомерных эмбрионов. Показатель суягности из расчета на донора составил: по ДПГ - 2, по ДПТ – 2,2, всего за два года из расчета на донора показатель суягности составил 2,1.

Из 33 использованных реципиентов окотилось 19 (56%; 2,1 на донора), при этом получено 20 ягнят-трансплантатов, что составило 30% от числа пересаженных эмбрионов. Из расчета на одного донора нами получено в период с 2002-2003 года 2,2 ягнят-трансплантатов, в том числе по ДПТ (2003 г.) – 2,4, а по ДПГ (2002 г.) – 2,0 ягнят-трансплантатов.

При этом следует отметить, что процент приживляемости был высок для овец ДПТ по сравнению с овцами ДПГ. Так, процент суягности составил для них 71 против 44, а процент приживляемости – 40 против 22. Объяснение этому следует искать, во-первых, в схеме гормонального воздействия и, во-вторых, в воспроизводительных особенностях овец ДПТ. В первом случае, как было отмечено выше (табл. 9.8.), для овец ДПГ дозы вводимых препаратов были высоки, а это, как известно, отрицательно влияет не только на физиологию размножения (новообразования в яичниках), но и на качество трансплантируемых эмбрионов, а, следовательно, и приплода (при имплантации возможны выкидыши). Данная проблема требует дальнейшего исследования.

Таблица 9.11. Взаимодействие между донором, эмбрионом, реципиентом и трансплантатом у овец (Садыкулов Т.С., Джамалова Г.А., Касымов К.Т., Буралхиев Б.А., 2002-2003 гг.)

Донор		Реципиент		Эмбрион		Окотилось реципиент ов		Получено ягнят	
Гено тип	п	День цикла	п	Стадия развития	п	п	%	п	%
ДПТ	5	1-2	12	Зигота-4-х бласт	23	9	75	9	39
		3-4	3	8 - 16 бласт	7	1	33	2	28
		Всего	15	Всего	30	11	71	12	40
ДПГ	4	1-2	13	Зигота-4-х бластом	26	5	38	5	19
		3-4	5	8 - 16 бластом	10	3	60	3	60
		Всего	18		36	8	44	8	22
Итого по породе			33	-	66	19	56	20	30

9.5.3. Фенотипическая изменчивость селекционируемых признаков овец-трансплантатов дегересской породы, рожденных от помесных овцематок-реципиентов (ДПТ X КТ) в марте 2002 и 2003 г.г.

Анализ живой массы ягнят при отбивке показывает, что трансплантаты с полутонкой шерстью несколько превосходят своих сверстников с полугрубой шерстью. При этом такая закономерность в большей мере наблюдается для баранчиков-трансплантатов. Одновременно в эти же сроки нами были изучены экстерьерные промеры телосложения опытных и контрольных групп ягнят (табл. 9.12. - 9.13.). Установлено, что существенная разница в пользу ягнят-трансплантатов наблюдается по следующим промерам:

- по высоте в холке: по баранчикам - на 8% при рождении, на 4,8% при отъеме; по ярочкам – на 3,1% и 3,0% соответственно;
- по косой длине туловища – на 4,3%; 2,2%; 3,0%; 4,6% соответственно;
- по обхвату груди – на 3,7%; 2,7%; 3,7%; 3,1% соответственно;
- по глубине груди – на 10,1%; 6,7%; 12,5%; 9,4% соответственно.
- по ширине груди, обхвату пясти и по высоте крестца, в среднем на 3%; 3,2%; 2% и 2,8% соответственно.

Таблица 9.12. Изменчивость живой массы ягнят разных генотипов 4,5 мес. в зависимости от величины курдюка (Садыкулов Т.С., Джамалова Г.А., Касымов К.Т., Буралхиев Б.А., 2002-2003 гг.)

Величина курдюка	ДПГ – 2002 г.р.					
	Баранчики			Ярочки		
	п	X±m	C _v	п	X±m	C _v
Большая	2	36,3±0,3	3	2	35±0,2	5
Средняя	1	32,4	-	2	30,1±0,3	6
Маленькая	-	-	-	1	25	-

Таким образом, сравнительное изучение роста и развития ягнят за молочный период – до 4,5 месячного возраста показало, что ягнота-трансплантаты заметно превосходили своих сверстников – не трансплантатов по живой массе на 3,5 - 4,5 кг и по экстерьерным промерам телосложения. В расчете на одну матку - донор было произведено мяса по живой массе 110-114 кг, против 33 - 35,5 кг по сравнению с обычным методом. Детальный анализ требует для сравнительной оценки эффективности использования помесных матерей-реципиентов проведение контрольного убоя баранчиков-трансплантатов в возрасте - 4,5 мес. Данный этап работы нами планируется провести на следующий год.

Таблица 9.13. Изменчивость живой массы ягнят разных генотипов 4,5 мес. в зависимости от величины курдюка (Садыкулов Т.С., Джамалова Г.А., Касымов К.Т., Буралхиев Б.А., 2002-2003 гг.)

Величина курдюка	ДПГ – 2003 г.р.					
	Баранчики			Ярочки		
	п	X±m	C _v	п	X±m	C _v
Большая	3	40±2,5	3	5	35,2±0,2	4
Средняя	2	33	-	1	31	-
Маленькая	0	-	-	1	31,3	-

Изучение показателей продуктивных и племенных качеств молодняка дегересских овец-трансплантатов, рожденных в 2002 -2003 годы, показало, что скорость их роста за постнатальный период развития проходил более интенсивно по сравнению с контрольной группой сверстников-полусибсов, полученных традиционным путем (табл. 9.14; 9.15; 9.16.).

Таблица 9.14. Экстерьерные промеры (см) ягнят-трансплантатов дегересской породы с полугрубой шерстью, рожденных в 2002 году (Садькулов Т.С., Джамалова Г.А., Касымов К.Т., Буралкисев Б.А., 2002-2003 гг.)

Возраст	Пол	Группа	n	Промеры тела (X ± m)						
				Высота в холке	Косая длина туловища	Обхват груди	Ширина груди	Обхват пясти	Высота в крестце	Глубина груди
При рождении	♂	Опытная	8	37,5 ± 0,5	36,5 ± 0,4	36,9 ± 0,2	8,8 ± 0,5	7,6 ± 1,6	36,5 ± 0,1	12,4 ± 1,99
		Контрольная	10	33,4 ± 0,3	34,3 ± 0,2	35,5 ± 0,2	8,7 ± 0,7	7,3 ± 0,4	35,4 ± 0,7	10,2 ± 1,0
	♀	Опытная	8	33,9 ± 1,1	34,8 ± 0,2	36,2 ± 0,0	7,4 ± 1,5	7,4 ± 0,5	29,6 ± 1,6	11,8 ± 2,76
		Контрольная	10	32,2 ± 0,6	33,1 ± 0,3	33,7 ± 0,4	7,3 ± 0,3	7,2 ± 0,6	29,1 ± 1,0	10,4 ± 0,82
44,5 месяцев	♂	Опытная	8	62,7 ± 1,5	59,9 ± 1,2	86,9 ± 1,1	22,0 ± 0,1	9,2 ± 0,7	62,9 ± 1,3	30,8 ± 0,4
		Контрольная	10	57,8 ± 0,2	58,2 ± 0,3	84,2 ± 0,3	21,6 ± 0,2	8,8 ± 0,8	62,5 ± 2,1	26,8 ± 0,0
	♀	Опытная	8	59,7 ± 0,8	55,6 ± 1,1	85,8 ± 1,4	23,5 ± 0,6	8,6 ± 0,7	56,8 ± 1,9	27,4 ± 1,4
		Контрольная	10	53,2 ± 0,9	55,2 ± 0,2	82,0 ± 0,6	22,1 ± 0,2	8,4 ± 0,4	55,6 ± 0,1	24,4 ± 0,2

Таблица 9.15. Экстерьерные промеры (см) ягнят-трансплантатов дегересской породы с полутонкой шерстью, рожденных в 2003 году (Садькулов Т.С., Джамалова Г.А., Касымов К.Т., Буралкисев Б.А., 2002-2003 гг.)

Возраст	Пол	Группа	n	Промеры тела (X ± m)						
				Высота в холке	Косая длина туловища	Обхват груди	Ширина груди	Обхват пясти	Высота в крестце	Глубина груди
При рождении	♂	Опытная	12	36,5 ± 0,7	36 ± 0,5	36,5 ± 0,5	8,08 ± 0,7	7,5 ± 1,2	35,5 ± 0,7	12,0 ± 1,9
		Контрольная	20	33,8 ± 0,2	34,5 ± 0,9	35,2 ± 0,1	8,07 ± 0,2	7,5 ± 0,1	35,5 ± 0,1	10,9 ± 1,0
	♀	Опытная	12	33 ± 1,6	34,8 ± 0,3	36 ± 0,6	7,4 ± 1,3	7,2 ± 0,4	29 ± 1,5	11,7 ± 2,7
		Контрольная	20	32 ± 0,3	33,8 ± 0,2	34,7 ± 0,4	7,38 ± 0,9	7,3 ± 0,2	29 ± 1,5	10,4 ± 0,8
44,5 месяцев	♂	Опытная	10	60,7 ± 1,4	59,3 ± 1,0	86,3 ± 1,8	22,0 ± 0,6	9,1 ± 0,3	62,8 ± 1,2	29,7 ± 0,8
		Контрольная	20	57,9 ± 0,1	58 ± 0,2	84 ± 0,4	21,6 ± 0,3	8,7 ± 0,3	62 ± 2,7	26,9 ± 0,1
	♀	Опытная	12	54,7 ± 0,7	56,5 ± 1,0	85,1 ± 1,5	23,5 ± 0,9	8,5 ± 0,8	55,8 ± 1,2	28,5 ± 1,6
		Контрольная	20	53,1 ± 0,1	54 ± 0,2	82,5 ± 0,2	23,3 ± 0,7	8,5 ± 0,1	55,8 ± 0,1	27,8 ± 0,3

Таблица 9.16. Изменчивость продуктивных качеств овец дегересской породы с полутонкой шерстью опытной и контрольной групп, рожденных в 2003 году (Садькулов Т.С., Джамалова Г.А., Касымов К.Т., Буралдиев Б.А., 2002-2003 гг.)

№	Живая масса, кг	Возраст	пол	Опытная группа			Контрольная группа		
				n	$\bar{X} \pm m_x$	$S_{\text{ок}}$	n	$\bar{X} \pm m_x$	$S_{\text{ок}}$
1	При рождении		♂	5	4,43±0,8	10	10	4,34±0,3	16
			♀	7	4,36±0,8	10	10	4,31±0,7	17
2	При отъеме		♂	5	37,6±0,4	10	10	31,4±1,4	10
			♀	7	31,1±1,2	10	10	28,0±1,3	8

Таблица 9.17. Изменчивость продуктивных качеств овец дегересской породы с полугрубой шерстью опытной и контрольной группы, рожденных в 2002 году (Садькулов Т.С., Джамалова Г.А., Касымов К.Т., Буралдиев Б.А., 2002-2003 гг.)

№	Живая масса, кг	Возраст	пол	Опытная группа			Контрольная группа		
				n	$\bar{X} \pm m_x$	$S_{\text{ок}}$	n	$\bar{X} \pm m_x$	$S_{\text{ок}}$
1	При рождении		♂	3	4,9±1,2	13	5	4,6±1,2	7
			♀	5	4,5±0,23	10	5	4,3±1,0	6
2	При отъеме		♂	3	41,21±0,6	7	5	36,8±0,4	8
			♀	5	37,1±1,5	6	5	34,4±0,4	9
3	12 месяцев		♂	3	51,5±0,2	12	5	46,3±0,1	17
			♀	5	43,5±0,2	10	5	38,0±0,4	12
4	18 месяцев		♂	3	64,6±0,2	7	5	60,4±1,2	16
			♀	5	53,0±0,3	8	5	50,0±1,4	14
4	Настриг шерсти, кг	12 месяцев	♂	3	3,6±0,1	4	5	3,2±0,7	8
			♀	5	2,9±0,5	2	5	2,6±0,2	5

Из таблицы видно, что для овец - трансплантатов превосходство по живой массе от своих сверстников - полусибсов составило при рождении по баранчикам на 6,5%, ярочкам – 9,7%, при отъеме - 14,4% и 9,5% и в годовалом возрасте – по живой массе на 11 - 16%; настригу шерсти – на 17 - 22%. Годовалые баранчики и ярочки - трансплантаты превосходили стандарт породы, установленные для животных класса элита по живой массе и настригу шерсти на 6,1 и 3,5; 0,6 и 0,5 кг соответственно. Овцы-трансплантаты в 18 мес., рожденные в 2002 году по баранам и маткам превосходили стандарт породы, установленные для животных класса элита по живой массе и настригу шерсти на 7,9% и 6%; 6,1% и 12% соответственно.

Необходимо отметить, что большой интерес для практической селекции представляет тот факт, что ягнята из контрольной группы (полусибсов) по сравнению со сверстниками – овцами - трансплантатами, характеризуются более высокой фенотипической изменчивостью (C_v) как по живой массе, так и настригу шерсти.

Это, на наш взгляд, объясняется фенотипическими и генотипическими различиями их маток, от которых они получены. Они различаются по уровню продуктивности, возрасту и племенной ценности. Так, при отборе овцематок - доноров предпочтение отдавалось только самым более однородным высокопродуктивным животным. Кроме того, они были в массе одного возраста (4,5 лет). Овцематки ягнят не трансплантатов были разных возрастов (от 1,5 до 5,5 лет) и относились как к классу элита, так и - к первому. При комплексной оценке (бонитировка) весь молодняк опытной группы относился к классу элита, тогда как у контрольной группы удельный вес элитных животных составил 60%.

Настриг шерсти у овец - трансплантатов дегересской породы достаточно высокий (табл. 9.16.). Проведен индивидуальный учет настрига шерсти овец - трансплантатов с полугрубой шерстью. Бараны и матки ДПГ типа в 12 месяцев по настригу шерсти превышают требования установленные для животных класса элита соответственно на 6,1% и 12%. Полученные результаты свидетельствуют об успешной адаптации и хороших приспособительных качествах дегересских овец - трансплантатов в зоне их разведения.

Данный раздел главы – это краткое содержание отчета по научно - исследовательской работе по теме «Ускоренное размножение ценных генотипов овец дегересской породы методом трансплантации эмбрионов» за 2003 год, проводимой лабораторией кафедры селекции и биотехнологии животных КазНАУ под руководством профессора Садыкулова Т.С. Мною она приведена для того, чтобы обучающийся мог на примере данной работы определить значимость проводимых исследований по биотехнологии на уровне нашей республики. Таким образом, можно сделать следующие заключения:

1. На одного суперовулированного донора дегересской породы было использовано 3,7 реципиентов.

2. Из 33 реципиентов окотилось 19 (57%), что из расчета на донора составило 2,1, в том числе 11 реципиентов в 2003 году окотились ягнятами ДПТ (2,2 на донора) и 8 реципиентов в 2002 году – ягнятами ДПГ (2,0 на донора).

3. От 19 окотившихся реципиентов получено 20 ягнят-трансплантатов (30% от числа пересаженных эмбрионов), что из расчета на донора составило 2,2, из

которых 12 ягнят ДПТ родились в 2003 году (2,4 на донора) и 8 ягнят ДПГ в 2002 году (2,0 на донора). В зависимости от пола рождено 8 баранчиков (3 гол. в 2002, 5 гол. в 2003 годы) и 12 ярочек (5 гол. в 2002 и 7 гол. в 2003 годы).

4. Ягнята - трансплантаты при отбивке по сравнению с контрольной группой сверстников – полусибсов, полученных традиционным путем крупнее на 0,6% для баранчиков и 0,7% для ярочек.

5. Для трансплантатов, рожденных в марте 2003 г в расчете на одну матку – донор от молодняка трансплантатов (баранчики и ярочки) в возрасте 4,5 - 5 мес. было произведено молодой ягнятины с живой массой 76 - 91 кг, против 32 - 37 кг, чем при обычном методе.

6. В расчете на одну матку донор от молодняка – трансплантатов 2003 г.р. было произведено молодой ягнятины с живой массой в возрасте 4,5 – 5 месяцев 76 - 91 кг против 32 - 37 кг, а 2002 г.р. соответственно – 62,9 - 69,5 кг против 29 – 34 кг, чем при обычном методе. Этот показатель для 12-месячных трансплантатов 2002 г.р. составил также соответственно 91,5 – 123 кг против 41 – 53 кг

В возрасте 18 мес. показатели живой массы овец -трансплантатов были исключительно высокими и значительно превышали стандарт породы, установленных для животных элитного класса. Это превышение по группе баранчиков составило 4,3 кг или 11,7 %, по группе ярок 5,1 кг или 14,5%. А производство шерсти в расчете на одну матку - донор от молодняка - трансплантата (баранчики и ярочки) составило 6,8 кг против 2,7 кг при обычном методе.

Следует отметить, что сотрудники лаборатории «Биотехнология животных» КазНАУ при кафедре селекции и биотехнологии очень тесно сотрудничают с коллегами из лаборатории по искусственному осеменению и трансплантации эмбрионов животных при КазНИТИО, руководителем которого является профессор Касымов К.Т. (с.Мынбаево, Алматинской обл).

Следует также отметить, как весьма важный положительный фактор, что в процессе вышеуказанных работ ежегодно участвуют около 20 - 30 студентов, аспиранты КазНАУ по специальности «Селекция и биотехнология в животноводстве».

Резюме

Как было отмечено в предисловии, в основу методов биотехнологии легли теоретические разработки по искусственному осеменению, гормональному регулированию воспроизводительной функции и трансплантации эмбрионов у животных. Перспективы использования методов воспроизводительной биотехнологии в практике разведения животных столь грандиозны, что уже сегодня в ряде стран эти исследования поставлены на коммерческую основу.

В зоотехнии по трансплантации эмбрионов животных сделан огромный прогресс. При том, что этот метод занял прочное место в селекционно-племенной работе, не следует забывать, что работы по совершенствованию методов супероуляции и трансплантации на сегодняшний день остаются актуальными.

Исходя из вышеизложенного, следует, что исследования по изучению генетической изменчивости физиологических критериев воспроизводства животных и разработка на их основе биотехнологических методов их исполь-

зования в селекции дали бы возможность резко увеличить интенсивность селекции на повышение воспроизводительной продуктивности. Данное новшество позволит улучшить генетически запрограммированный воспроизводительный потенциал животных путем использования их биологического, физиологического, клеточного и экологического резервов.

Как известно, в Казахстане наблюдается резкое снижение поголовья животных, что связано, прежде всего, с экономическими катаклизмами периода перестройки. Поэтому для нашей Республики наиболее актуальным на сегодняшний день является увеличение поголовья животных, имеющих ценный генотип. А улучшение генотипа животных путем изменения физиологической программы воспроизводства позволит методам биотехнологии занять прочную позицию в практике разведения животных Казахстана. Это свидетельствует о том, что ускоренное размножение ценных генотипов животных методами биотехнологии при изучении физиологических и экологических аспектов их разведения является наиболее важной задачей в увеличении поголовья животных.

Ключевые слова и понятия:

Биологически неполноценные эмбрионы

Биологически полноценные эмбрионы

Биоматериал

Вымывание эмбрионов

Вымывание эмбрионов методом убоя

Методы вымывания эмбрионов

Методы пересадки эмбрионов

Метод лапароскопии

Неоплодотворенные ооциты

Нехирургический метод трансплантации

Пересадка эмбрионов

Приживляемость эмбрионов

Процент потерь

Процент приживляемости

Процент суягности

Трансплантация эмбрионов

Хирургический метод трансплантации

Физиологическая

взаимосвязь

Контрольные вопросы:

1. Что понимают под понятием «трансплантация эмбрионов в животноводстве»?
2. Какие задачи решает метод трансплантации эмбрионов в животноводстве?
3. Какие методы трансплантации эмбрионов Вы изучили?
4. От чего зависит выбор метода трансплантации эмбрионов в животноводстве?
5. Какими преимуществами обладает хирургический метод трансплантации эмбрионов?
6. Какими преимуществами обладает нехирургический метод трансплантации эмбрионов?
7. Какие недостатки характерны для хирургического и нехирургического методов трансплантации эмбрионов?

8. Какие правила необходимо соблюдать при подготовке самок к процедуре по вымыванию или пересадке эмбрионов?

9. Что подразумевают под термином "биоматериал"?

10. Почему биоматериал не однороден? От чего зависит состав биоматериала?

11. Дать определение следующим понятиям: вымываемость эмбрионов, приживляемость эмбрионов.

12. Какие факторы влияют на вымываемость эмбрионов?

13. Какие показатели необходимо вычислить, чтобы охарактеризовать влияние материнского эффекта на рост и развитие трансплантатов?

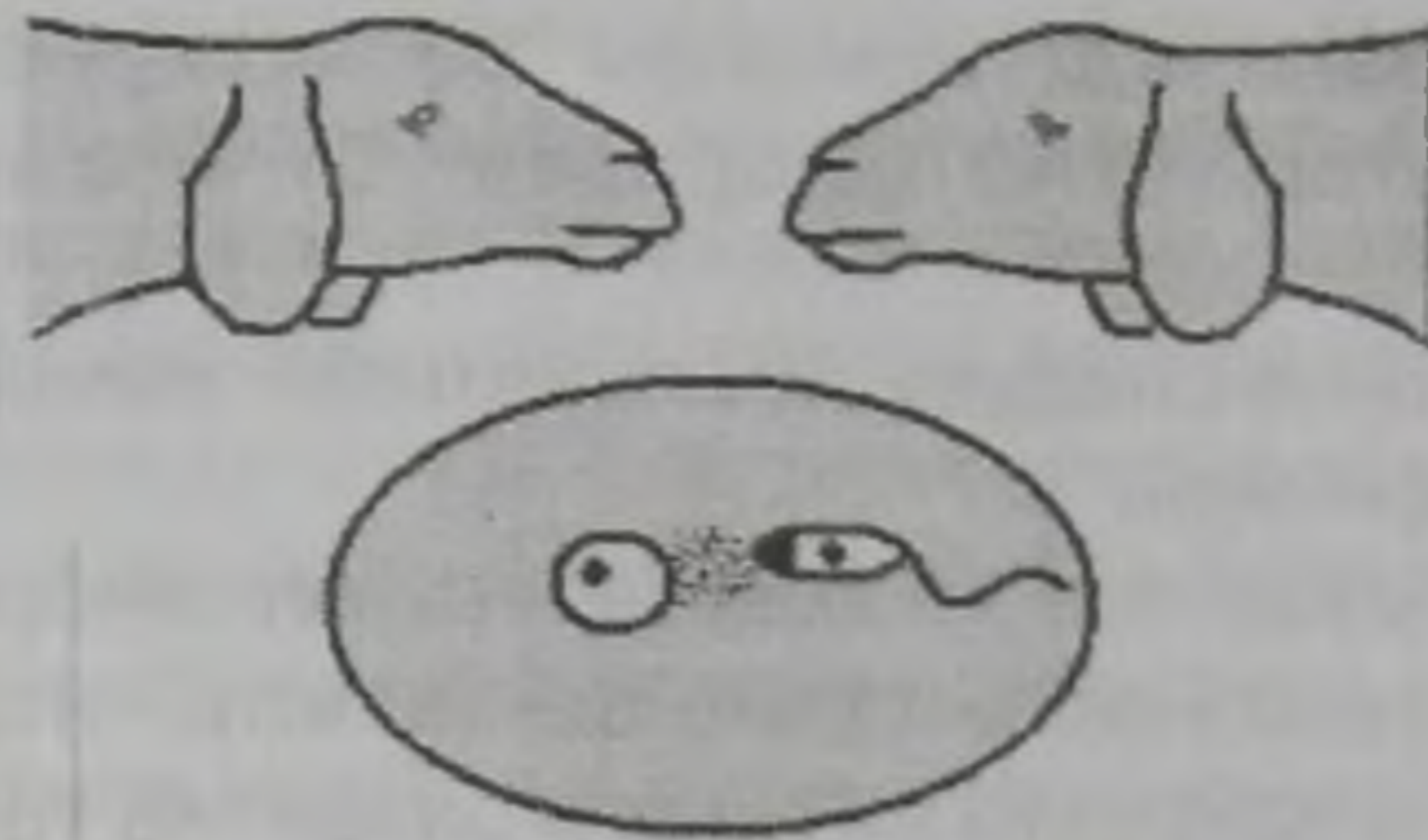
14. Какие факторы влияют на процент приживляемости трансплантируемых эмбрионов?

15. Влияет ли видовая принадлежность на выбор метода трансплантации эмбрионов?

Рекомендуемая литература. Для более глубокого и детального изучения вопросов, касающихся биотехнологии трансплантации эмбрионов животных можно обратиться к следующим работам: Завертяев Б. П., 1989 (Биотехнология в воспроизводстве и селекции крупного рогатого скота), Эрнст Л. К., 1989. (Трансплантация эмбрионов сельскохозяйственных животных), Мурзамадиев А. М., Ертаев Е. Е., Салыкбаев Т. Н., 1992 (Биотехнология в воспроизводстве овец), Хантер Р. Х. Ф., 1984 (Физиология и воспроизводство домашних животных), G. Wiener, 2001 (Animal Breeding).

Для изучения этого вопроса с научной точки зрения заинтересованному читателю можно обратиться к научным журналам серии "Биотехнология", "Животноводство" и "Молекулярная биология".

ЧАСТЬ III. ЭМБРИОКУЛЬТУРА



Работы в области эмбриокультуральных исследований на сегодняшний день являются актуальными. К сожалению, наши знания в области культивирования еще настолько малы, что мы не можем контролировать развитие гамет, а также обеспечить инкубацию эмбриона, а в дальнейшем и плода в условиях *in vitro*. Поэтому чем глубже наши знания в области морфологических, физиологических и биохимических преобразований, происходящих при росте и развитии живой системы, тем шире наши возможности в управлении такими важными биологическими процессами, как гаметогенез и эмбриогенез в условиях *in vitro*.

Теоретическим фундаментом для эмбриокультуральных исследований в животноводстве служит клеточная теория, основные положения которой свидетельствуют о том, что:

1) клетка – эта структурная и функциональная единица живой материи; 2) клетки различных тканей, различных организмов гомологичны по своему строению; 3) размножение клеток происходит только путем деления исходной клетки; 4) клетка – это часть целостного организма, она специализированна, имеет определенные функции и структуру; 5) клетки одного организма взаимосвязаны в функциональные системы тканей, органов и систем органов.

Это самое широкое и фундаментальное из всех биологических обобщений. Данная теория представляет собой результат многочисленных исследований, проведенных в начале XIX в. такими учеными, как Ж.Б. Ламарк (1809), М.Шлейден (1838), и Т.Шванн (1839), Р.Вирхов (1858). Термин «клетка» принадлежит физику Р.Гуку (1665). Строение клетки впервые описали М.Мальпиги (1671-1675), Н.Грю (1671), А.Левенгук (1673-1695).

Глава 10. Основы клеточной биологии

Цель: Ознакомиться с биологической сущностью гамет и изучить гаметогенез млекопитающих животных.

После изучения главы студент сможет:

- дать определение терминам «развитие», «фолликулогенез», «овуляция» и раскрыть биологическую сущность гамет животных;
- охарактеризовать этапы развития гамет;
- иметь представление о процессах, происходящих при гаметогенезе;
- иметь общее представление о фолликулогенезе;
- использовать для гамет и эмбрионов регулирующие факторы роста и развития.

10.1. Клетка – элементарная единица живого

В живой природе существуют связанные между собой уровни организации, результатом интеграции которых является жизнедеятельность организма. В органическом мире различают два типа организации жизни: доклеточную (вирусы) и клеточную (прокариоты, эукариоты).

Отличительными признаками клеток эукариот от прокариот являются: наличие в клетках эукариот обязательной структуры - клеточного ядра, которого нет у прокариот; в цитоплазме эукариот существует целый набор специальных структур – органелл, выполняющих отдельные специфические функции; эукариотические клетки обычно крупнее прокариотических. Несмотря на четкие морфологические отличия, клетки прокариот и эукариот имеют много общего, что и позволяет их отнести к одной, клеточной системе организации живого: наличие плазматической мембраны, обладающей сходной функцией активного переноса веществ из клетки и внутрь ее; синтез белка происходит на рибосомах; синтез РНК и репликация ДНК (только общие принципы); биоэнергетические процессы.

Исходя из вышеизложенного, клетке можно дать общее определение. Клетка – это ограниченная активной мембраной, упорядоченная, структурированная система биополимеров (белков, нуклеиновых кислот, липидов, углеводов и др.), участвующих в единой совокупности метаболических и энергетических процессов, осуществляющих поддержание и воспроизведение всей системы в целом.

Таким образом, гомологичность в строении клеток определяется сходством общеклеточных функций, направленных на поддержание жизни самих клеток (синтез белков, нуклеиновых кислот, биоэнергетики клетки и др.) и на их размножение. Разнообразие же в строении клеток – это результат функциональной специализации и следствие эволюционной приспособленности и изменчивости. При

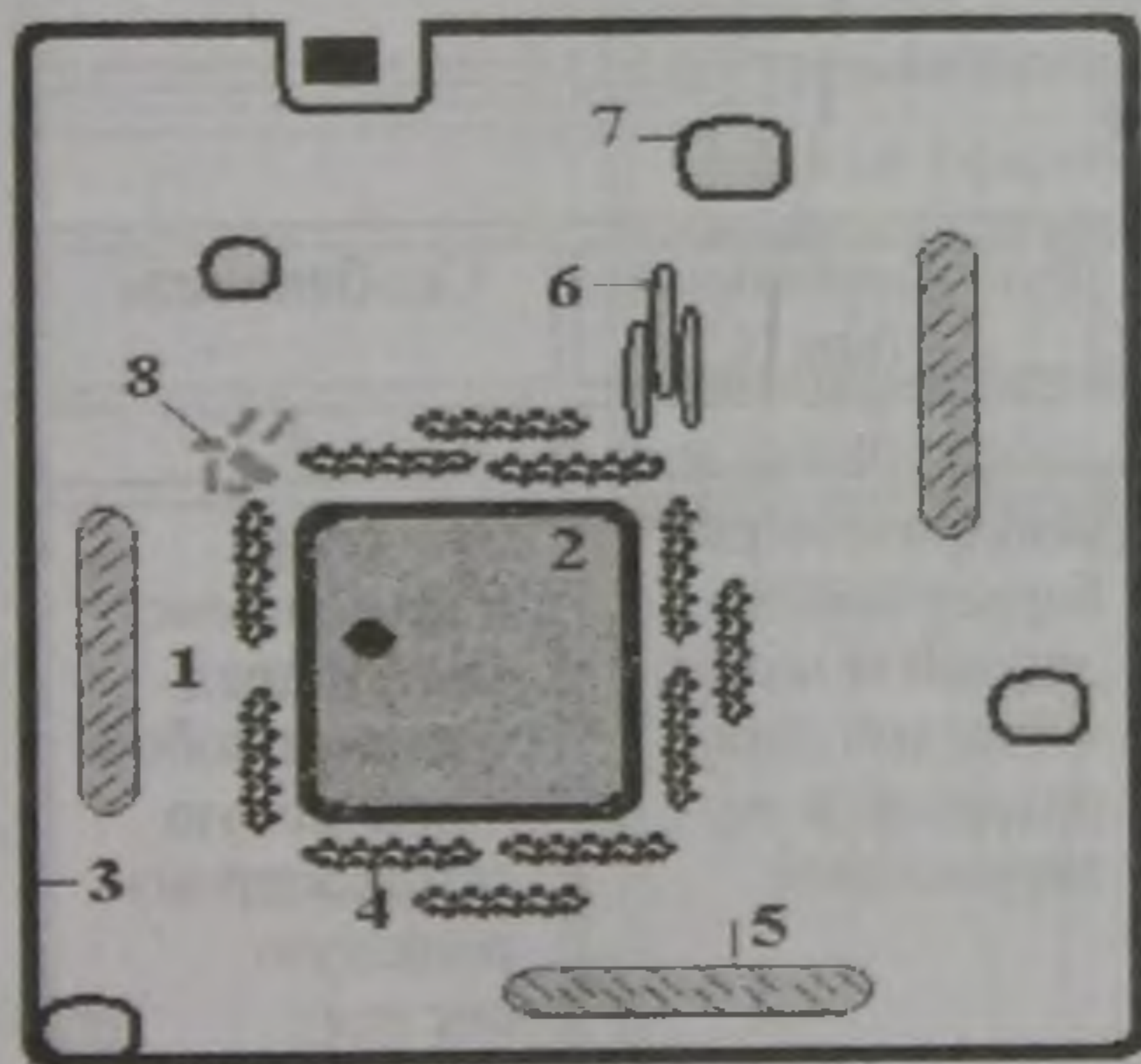


Рисунок 10.1. Упрощенная схема строения соматической клетки животных.

1 – цитоплазма; 2 – ядро; 3 – плазматическая мембрана; 4 – эндоплазматический ретикулум; 5 – митохондрия; 6 – рибосома; 7 – лизосома; 8 – аппарат Гольджи.

этом различия можно наблюдать даже в пределах одного многоклеточного организма, например, у животных сравним яйцеклетку со сперматозоидом. Во-первых, эти клетки мало похожи друг на друга по форме, хотя обе выполняют одну и ту же функцию – сливаясь, образуют клетку – зиготу, которая является началом зарождения новой жизни. Во-вторых, для каждого из них характерно наличие специфических черт. В них кроме общеклеточных структур (мембранные системы, ядро, рибосомы, митохондрии и др.) можно отметить специфические особенности. Так, для яйцеклеток – это наличие большого запаса питательных веществ, которые необходимы после оплодотворения будущему эмбриону, а для сперматозоидов – наличие длинного хвоста, что необходимо для продвижения в гениталиях самки.

Каким образом возникает разнообразие клеток в многоклеточных организмах? Современная биология на базе представлений эмбриологии, молекулярной биологии и генетики считает, что индивидуальное развитие от одной клетки (зиготы) до зрелого многоклеточного организма – это результат последовательного, избирательного включения работы разных генных участков хромосом в различных клетках. Это, в свою очередь, приводит к появлению клеток со специфическими для них структурами и особыми функциями, т.е. к процессу, называемому дифференцировкой. Это означает, что любая клетка данного организма обладает полным одинаковым фондом генетического материала, т.е. клетка *тотипотентна* – но в разных клетках одни и те же гены могут находиться или в активном или в репрессивном состоянии. Таким образом, многоклеточные организмы представляют собой сложные ансамбли клеток, объединенные в целостные интегрированные системы тканей и органов, подчиненных и связанных межклеточными, гуморальными и нервными формами регуляции.

10.2. Биологическая сущность соматических клеток животных

Морфологическая сущность. Клетка животных состоит из цитоплазмы, в которой расположены ядро и органоиды, окруженные плазматической мембраной (рис. 10.1.).

Цитоплазма состоит из водянистого основного вещества - гиалоплазмы и находящихся в нем ядра, разнообразных органелл и включений. Гиалоплазма объединяет различные структуры клетки и обеспечивает их взаимодействие.

Таблица 10.1 Структура клеток животных			
Наименование	Структура	Функциональная сущность	Особенность
1	2	3	4
Плазматическая мембрана	В физическом аспекте - это тонкая пленка толщиной около 10нм, а в химическом – это структура, состоящая из двух основных компонентов: два слоя липида между двумя слоями белка	Избирательный барьер между данной микроскопической лабораторией и ее окружением	Благодаря плазмолемме клетка представляет собой химическую самовоспроизводящую систему
Ядро	Обязательная составная часть животной клетки. Клеточное ядро состоит из ядерной оболочки, хроматина, ядрышко и ядерного сока	Носитель генетической информации.	Контролирует все процессы жизнедеятельности

1	2	3	4
Эндоплазматический ретикулум (ЭР)	Система уплощенных мембранных мешочков – цистерн - в виде трубочек и пластинок. Образует единое целое с наружной ядерной мембраной	ЭР участвует в процессах синтеза, транспорта; содержит ферменты, играющие активную роль в обмене веществ	Многочислен в секреторно активных клетках
Рибосома	Это очень мелкие органеллы, представляют собой гранулы диаметром около 15 - 35 нм. Каждая рибосома (80S) состоит из двух субчастиц – малой (30S) и большой (50S)	Место синтеза белка	Рибосомы имеются также в составе ядра, где они обеспечивают синтез ядерных белков
Митохондрии	Между двумя мембранами лежит пространство, которое заполнено гомогенным митохондриальным матриксом	Энергетический резервуар	Больше всего содержится в гаметах (около 300000)
Аппарат Гольджи (АГ)	Это стопка уплощенных мембранных мешочков – цистерн, которые связаны с системами пузырьков (пузырьки Гольджи)	Вывод секретов жизнедеятельности за пределы клетки	Место локализации – вблизи центриолей, окружает ядро
Лизосома	Простые сферические мембранные мешочки (0,2 – 0,5 мкм), ограниченные мембраной и заполненные пищеварительными ферментами	Внутриклеточное ферментативное расщепление как экзогенных, так и эндогенных веществ	В случае выхода ферментов из лизосом в цитоплазму происходит растворение клетки (например, инволюция молочной железы при прекращении лактации)

Органеллы – структуры цитоплазмы, выполняющие в клетке специфические функции. К ним относят клеточный центр, митохондрии, аппарат Гольджи, эндоплазматический ретикулум, рибосомы, лизосомы (табл. 10.1).

Молекулярная сущность. Клетку можно сравнить с минихимической лабораторией, в которой осуществляется синтез и расщепление множества разнообразных веществ. На этой химической фабрике работа выполняется изотермически при температуре тела, низкой ионной силе и в некоторых уз-

ких пределах рН. "Машинами" используемые для преобразования энергии на этой фабрике, являются ферменты.

Химический состав клетки определяется специфичностью обмена веществ организма. Известно, что четыре элемента составляют 96% массы животного – это углерод, кислород, водород и азот. До 35% в тканях содержится калий, кальций, натрий, фосфор и другие макроэлементы. Микроэлементы (медь, марганец, кобальт, цинк и др.) содержатся в клетках в сотых долях процента. Таким образом, в клетке химические компоненты можно разделить на неорганические (вода ~ 85% и минеральные соли ~ 1,5%) и органические (белки ~ 10%, углеводы ~ 0,4%, нуклеиновые кислоты ~ 1,1%, липиды ~ 2%).

Физиологическая сущность. Описание морфологического строения и молекулярных свойств основных компонентов клетки еще не дает представления о ней как о живой системе, которая взаимосвязана с окружающей средой.

Чтобы получить полное представление о клетке, необходимо ознакомиться не только с ее строением, но и с жизненными функциями, которые присущи животной клетке. Основными функциями клетки являются: обмен веществ, движение, размножение, раздражимость.

Обмен веществ. Любое проявление жизнедеятельности организма связано с непрерывающимся поступлением в него одних веществ, их переработкой и выделением других. Вся жизнедеятельность клетки: размножение, движение, раздражимость, формообразование и рост основаны на обмене веществ. Качественная особенность живого, отличающая его от неживой природы, состоит в единстве процессов постоянного созидания вещества – ассимиляции и разрушения его – диссимиляции.

Усвоенные клеткой питательные вещества могут использоваться в различных направлениях: одна часть идет на построение живого вещества, другая может откладываться как запас энергетического (жир, гликоген) или питательного (желток в яйцеклетках) материала. Конечные продукты обмена веществ вредны для организма и выводятся из него через специальные органы выделения.

Движение. Энергия, которая освобождается при диссимиляции, потребляется клеткой на химические превращения, которые совершаются в самой клетке. Частично энергия освобождается в виде тепла, а также тратится на внешнюю работу, одним из проявлений которого является движение.

Различают пассивные и активные формы движения живого вещества. Наиболее простой формой активного движения живого вещества является амебовидное (лейкоциты), а более сложное движение обуславливается дифференцировкой у клеток специальных образований в форме жгутиков (сперматозоид).

Раздражимость – это способность клетки реагировать на внешний мир. Факторы, вызывающие раздражение называют *раздражителями*. К раздражителям относят различные колебания тепловой, химической, лучистой, электрической и других видов энергии. Проявления раздражимости зависят от характера воздействия и от строения самого организма. Чем выше организация животного и чем совершеннее строение его нервной системы, тем сложнее ответная реакция.

Размножение – это одно из основных свойств живого. Именно благодаря этому свойству происходит новообразование (рост) и обновление клеток. Размножение клеток животных происходит путем деления. Различают два способа деле-

ния: простое (прямое – амитоз) и сложное (непрямое – митоз). Непрямое деление клетки сопровождается глубокими изменениями в ядре. Эти изменения и определяют характер деления.

10.3. БИОЛОГИЧЕСКАЯ СУЩНОСТЬ ГАМЕТ ЖИВОТНЫХ

Двуполость (самка, самец) у высших животных свидетельствует о половом их размножении. Преемственность между поколениями осуществляется половыми клетками – гаметами. Различают два типа гамет: у самок животных – это крупные неподвижные *яйцеклетки*; у самцов – это мелкие, способные передвигаться *сперматозоиды*. А. Левенгук и его ученик Л. Гамм в 1677г. открыли сперматозоид, а К.Э. Байэр открыл яйцеклетку только через 150 лет.

Гамета развивается в половых железах и раньше, чем достигнет специализации, проходит ряд сложных превращений, которые делают ее отличными от всех остальных клеток организма.

Сперматозоид – это мелкая, способная передвигаться гаплоидная клетка самцов животных, приспособленная к внедрению в яйцеклетку с целью активации и зарождения нового индивида путем восполнения видового наследственного материала. Сперматозоид содержит ядро и цитоплазму с ее обычными органоидами. Специальная дифференцировка цитоплазмы обуславливает его способность к движению. Строение сперматозоидов обусловлено их функцией, поэтому они состоят из головки, шейки и хвостового отдела (рис. 10.2; табл. 10.2.).

Головка – это передняя часть сперматозоида, длина ее составляет приблизительно 4-6 мкм, она всегда расширена. Большую часть головки занимает плотное богатое нуклеопротеидами ядро, в нем локализуется наследственный материал (мужской набор плотно упакованных хромосом). Сперматозоиды гетерогенны, так как в их ядрах имеются разные типы половых хромосом. Впереди ядра находится акросома (across – верхний, крайний, soma – тело) – это небольшая плотная гранула, заключенная в вакуолю. Она образует переднюю часть головки. Акросома образуется в результате сложной перестройки комплекса Гольджи. В акросоме находятся акросомная нить и ферменты гиалуронидаза, спермолизины (D, E) и про-акрозин. Под влиянием ферментов при оплодотворении у яйцеклетки разрушается целостность вторичной оболочки, что необходимо при проникновении сперматозоида внутрь яйцеклетки. Акросома играет существенную роль в стимуляции яйцеклетки к дальнейшему развитию.

Таблица 10.2. Характеристика сперматозоидов основных видов сельскохозяйственных животных (показатели усреднены)

Вид животного	Длина сперматозоида, мкм	Длина головки, мкм	Скорость движения, мкм/с	Количество в 1 мл, млрд
Бык	65	6,5	120	1-2
Баран	54	4,5	50	2-4
Хряк	57	8,5	70	0,2
Жеребец	60	8	90	0,1

За головкой расположена *шейка*, длиной приблизительно 0,6 мкм и состоящая из двух центриолей: *проксимальной* и *дистальной*. Первая при оплодотворении вносится в цитоплазму яйцеклетки, обуславливая ее деление. Вторая также имеет две части: переднюю и заднюю. От передней начинается осевая нить хвостика, поэтому ее относят к аппарату движения сперматозоида. Задняя часть дистальной центриоли имеет форму кольца и находится на границе начальной и главной частей хвостового отдела сперматозоида.

Хвостовой отдел, длина которого находится в пределах 20 -30 мкм, состоит из начальной, главной и концевой частей. В центре всего хвостового отдела проходит осевая нить, которая является его сократимым элементом. Обычно хвост бывает сильно вытянут и по длине во много раз превосходит головку. В начальной части хвостика сосредоточена основная масса цитоплазмы сперматозоида. Здесь много митохондрий, которые встраиваются по спирали вокруг осевой нити.

Функциональная сущность хвоста – обеспечивает продвижение сперматозоида в гениталиях самки. Внутри яйцеклетки у сперматозоида органом движения становится дистальная центриоль. Сперматозоиды способны к движению в направлении яйцеклетки (хемотаксис) и против тока жидкости (реотаксис). Они обладают минимальным запасом питательных веществ, которые очень быстро расходуются при их движении. В хвосте содержатся ферменты сукциндегидраза и аденозинтрифосфатаза, а также сократимый белок – спермозин, которые в комплексе обеспечивают движение сперматозоида.

У животных с внешним осеменением поступательное движение сперматозоида совершается по спирали. Сперматозоиды животных с внутренним осеменением двигаются в половых путях самки прямолинейно. Скорость движения сперматозоидов довольно высокая, в среднем, он равен 7,5 см/сек. Таким образом, сперматозоид обеспечивает встречу и создает необходимые условия для своего внедрения в яйцеклетку.

Длина сперматозоидов разных животных неодинакова, но, в основном, эти клетки мелкие. Никакой зависимости между размерами сперматозоидов и величиной животного не обнаруживается. Так, сперматозоид воробья имеет длину 200, морской свинки – 100, быка – 65, человека – 55 - 60 и кролика – 20 мкм.

Яйцеклетка – это гаплоидная, крупная, недвижимая половая клетка самок животных, приспособленная для полового слияния с целью активации и дальнейшего эмбрионального развития (рис. 10.3.).

Головка
(6 мкм)

Шейка

Промежуточный
отдел (7 мкм)

Хвост
(60 мкм)

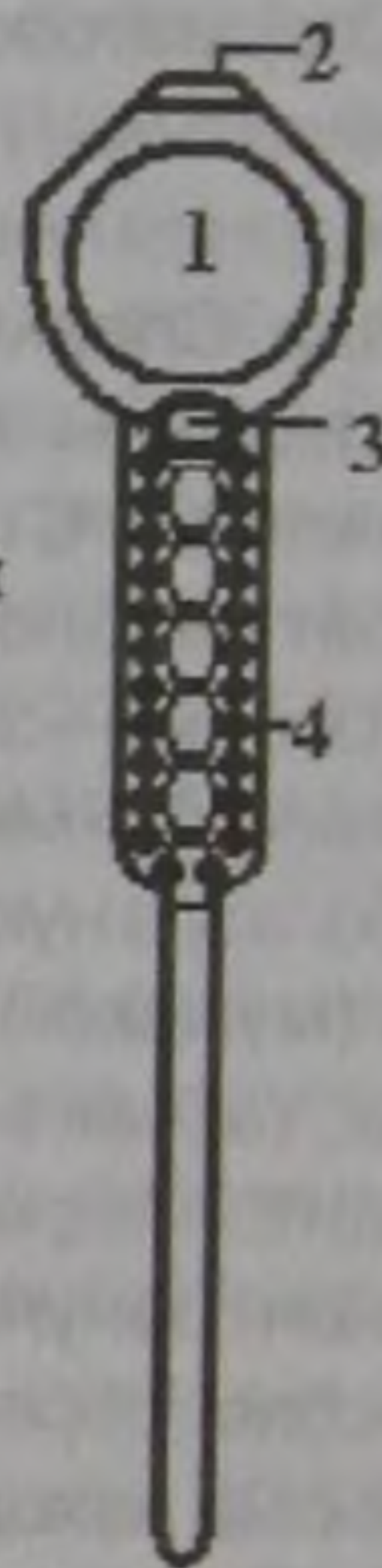


Рисунок 10.2. Упрощенная схема строения сперматозоида (продольный разрез, размеры отделов усреднены).

1 – ядро; 2 – акросома; 3 – центриоль; 4 – митохондрии.

Как все соматические клетки и сперматозоид, яйцеклетка содержит ядро и цитоплазму, а снаружи окружена плазматической мембраной. В цитоплазме располагаются органеллы и включения и, кроме того, она служит резервуаром для огромного запаса питательных веществ (желточные пластины, нуклеопротеиды, липохондрии, гранулы гликогена и пр.), которые необходимы после оплодотворения для эмбриогенеза. Благодаря этой особенности ядерно - цитоплазматическое соотношение в яйцеклетке равно 1:550 (против 1:6).

Отличительные свойства зрелых яйцеклеток – содержание в ядрах гаплоидного числа хромосом, неспособность к делению в связи с отсутствием центриоли (она исчезает в процессе развития и созревания ооцита), низкий уровень процессов ассимиляции и диссимиляции.

Овулировавшая яйцеклетка млекопитающих – это заранее запрограммированная клетка, имеющая размеры от 110 до 160 мк и покрытая тремя слоями оболочек (рис. 10.3.): первичная (желточная), имеется у млекопитающих всех видов, синтезируется самим ооцитом; вторичная (блестящая) – *zone pellucid* (ZP), внутренняя сторона которой синтезируется самим ооцитом, а наружная – фолликулярными клетками; третичная, хорошо развита у птиц, формируется после овуляции при прохождении ооцита по яйцеводу.

Особенностью для овулировавших яйцеклеток млекопитающих является то, что они окружены *zone pellucid*, вокруг которой фолликулярные клетки образуют лучистый венец, переходящий в яйценосный бугорок. ZP не прилегает к плазматической мембране ооцита и между ооцитом и ZP образуется перивителлиновое пространство. *Zone pellucid* окружает ооциты и предимплантационные эмбрионы. Толщина этой оболочки варьирует у разных видов животных: у мышей она тонкая и легко прокалывается иглой, у кроликов и норок – она наиболее толстая и прочная.

10.4. КУЛЬТИВИРОВАНИЕ ГАМЕТ IN VIVO

Гаметогенез (табл. 10.3.) – это период собственного развития половых клеток, процесс превращения диплоидных первичных половых клеток в гаплоидные дифференцированные женские (яйцеклетка) или мужские (сперматозоид) половые клетки. В зависимости от половой принадлежности гаметогенез делят на сперматогенез и оогенез.

Сперматогенез состоит из четырех этапов: размножение, рост, созревание и формирование, а оогенез из трех: размножение, рост и созревание.

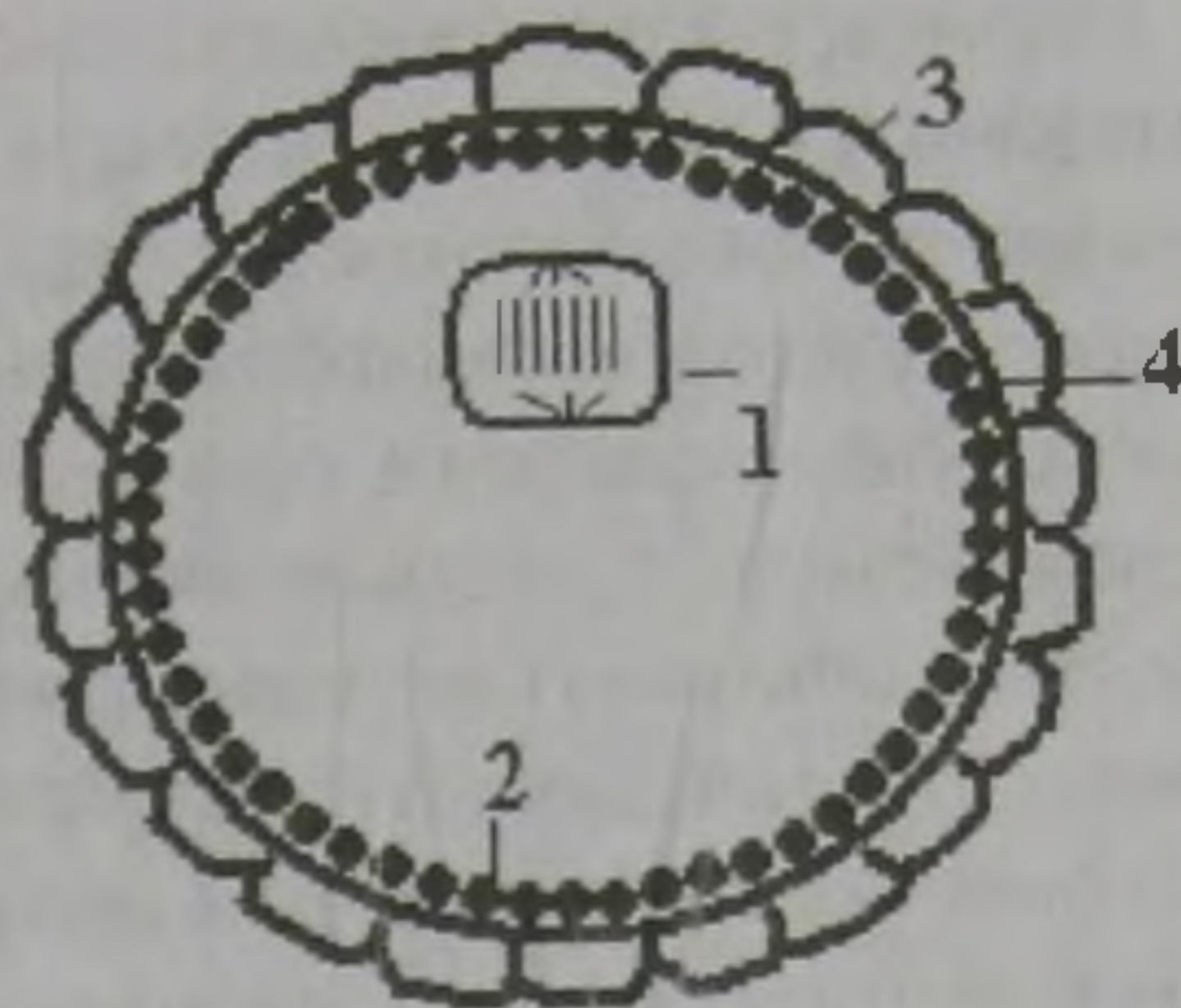


Рисунок 10.3. Упрощенная схема строения овулировавшей яйцеклетки (ооцит второго порядка).

1 – хроматин второго деления мейоза; 2 – кортикальные гранулы; 3 – *corona radiata*; 4 – *zone pellucid*.

1. *Период размножения (гонии – сперматогонии, оогонии)*. После оседания в зачатке гонады и по мере их развития путем активного размножения первичные половые клетки превращаются в сперматогонии или оогонии, число которых благодаря митозу сильно возрастает. При этом, превращение первичных половых клеток в гонии сопровождается рядом изменений: они становятся крупнее, приобретают округлую форму, теряют амебовидную подвижность и начинают активно размножаться (пролиферация). Оболочки гониев легко проницаемы и поступающие через них питательные вещества служат источником энергии для интенсивного деления клеток. У большинства млекопитающих самок пролиферативная активность оогониев прекращается до рождения, а у самцов – к моменту полового созревания.

2. *Период роста (гоноцит – сперматоцит или ооцит I порядка)*. От периода размножения гонии переходят к стадии роста, становясь сперматоцитами или ооцитами I порядка (названы так потому, что они находятся в процессе первого деления мейоза).

В период роста половые клетки уже не делятся. Всасываемые питательные вещества ассимилируются цитоплазмой и обуславливают интенсивный рост клеток. Но при сравнении с ооцитами I порядка, размеры сперматоцитов I порядка увеличиваются незначительно.

Рост ооцитов неравномерен. Условно различают два периода роста: претеллогенез (цитоплазматический рост) и вителлогенез (трофоплазматический рост).

Таблица 10.3. Оогенез

Этап	Механизм деления	Тип половых клеток	Стадия жизненного цикла	Характеристика и особенность
Репликация	Клетка зачаткового эпителия (первичная половая клетка - ИПК)	Первичная	Внутриутробно с развитием	После оседания в зачатках гонады ИПК начинают активно размножаться.
	Митоз	Оогонии		Число хромосом - 2n.
Профаза	Мейоз I	Ооцит первого порядка	Рождение	Рост ооцитов неравномерен. Условно различают два периода роста: <i>превителлогенез</i> (цитоплазматический рост) и <i>вителлогенез</i> (трофоплазматический рост).
	Интерфаза	Ооцит первого порядка, примордиальный фолликул	До полового созревания	Размер ядра увеличивается, хромосомы имеют вид длинных тонких деспиризованных нитей, каждая из которых состоит из двух хроматид, соединенных в одном месте общей центромерой, происходит <i>конъюгация</i> гомологичных хромосом (синапсис), которое ведет к обмену генетическим материалом между гомологичными хромосомами.
	Профаза	Ооцит первого порядка, первичный фолликул	Половое созревание	<i>Первое блокирование мейоза</i> в ооцитах происходит во время диплонемии (на стадии так называемой диктиотены - диффузной диплонемии). В таком состоянии ооциты участвуют в фолликулогенезе (образуются <i>первичные фолликулы</i>). После того, как вокруг ооцита завершается образование первого слоя фолликулярных клеток, начинается формирование прозрачной клеточной оболочки - <i>zone pellucida (ZP)</i> . Продолжительность стадии диктиотены различна: от нескольких месяцев у мышей до 15-50 лет у приматов. С прекращением роста формируется карносфера. В ооцитах на стадии пахнемы происходит амплификация генов. Кроме того, продолжается образование фолликулярных клеток, а далее начинает формироваться антрум.
Рост	Метафаза	Ооцит первого порядка, третичный	До овуляции	Ооциты возобновляют мейоз, находясь в антральных фолликулах. <i>Тетрады</i> встраиваются вдоль метафазной пластинки.
	Анафаза			Хромосомы начинают перемещаться к противоположным

				<p>полосам веретена. Обе сестринские хроматиды каждой хромосомы удерживаются вместе при помощи центромеры. Хиазмы разрываются и, кроссинговер завершается. Начинается разделение клетки.</p> <p>Два дочерних ядра отделяются друг от друга и, вокруг каждого из них вновь образуется ядерная оболочка. Каждое ядро содержит гаплоидное число хромосом (n), но каждая хромосома все еще содержит по две сестринские хроматиды (2c), соединенные центромерой. В оогенезе образуется <i>первое направленное тельце</i>.</p> <p>Пары сестринских хромосом конденсируются и прикрепляются к веретену.</p> <p>Фолликул перемещается к поверхности яичника, содержание в нем фолликулярной жидкости возрастает, в результате чего он выступает над яичником.</p> <p>Неактивированная овулированная яйцеклетка. Хромосомы выстраиваются по экваториальной плоскости. Наступает <i>второе блокирование</i>, которое продолжается до оплодотворения сперматозоидом.</p>
Телофаза				
Мейоз II Профаза	Ооцит второго порядка, третий фолликул			
Метафаза	Ооцит второго порядка, фолликул		Овуляция	
Начало от оплодотворения, млн				
Анафаза	Ооцит второго порядка		После оплодотворения	Начинается расхождение хроматид и их движение к полюсам.
а) ранняя 20 – 30 млн				
б) поздняя 60 млн				Закончилось расхождение хроматид. Начинается цитотомия.
Телофаза II				
а) ранняя 70 – 90 млн				Каждая из хромосомных групп достигла полюса веретена.
б) поздняя 90 – 100 млн	Оплодотворенная яйцеклетка			Происходит конденсация обеих групп хромосом и их преобразование в хроматинные массы. Осуществляется отделение <i>второго направленного тельца</i> .

Превителлогенез – это период малого роста, который начинается с момента вступления оогоний в мейоз и протекает на фоне его профазы. Ооцит растет за счет собственного синтеза РНК, белка и других компонентов. При этом масса ядра и цитоплазмы увеличивается пропорционально.

Вителлогенез – период большого роста, характеризуется резкой интенсификацией цитоплазмы, что ведет к изменению ядерно-цитоплазматического соотношения (от 1:6 к 1:550). Увеличение массы цитоплазмы происходит за счет поступления веществ извне.

Во время роста ооцит I порядка накапливает большое количество необходимых органелл (рибосомы, митохондрии), запасы питательных веществ (белок) и источников энергии. Размеры ооцита возрастают существенно. Например, у курицы за последние 6 дней перед выпадением ооцита из яичника объем ооцита возрастает в 200, а у мышей – в 300 раз.

У млекопитающих ооциты меньше по размеру; диаметр яйца возрастает, в среднем, от 20 до 85 – 160 мкм, что соответствует увеличению объема более чем в 40 раз. У самцов животных с сезонным циклом половой жизни между периодами роста и созревания наступает пауза, тогда как у остальных животных созревание мужской половой клетки следует сразу после завершения стадии роста.

3. Период созревания (сперматид, ооцит II порядка). Период созревания характеризуется двукратным делением клетки. Следовательно, при мейозе только одно удвоение числа хромосом сопровождается двумя следующими друг за другом делениями клеток.

Таблица 10.4. Продолжительность созревания ооцитов у основных видов сельскохозяйственных животных

№	Показатель	Видовая принадлежность			
		Крольчиха	Овцематка	Свиноматка	Корова
1	Число овулировавших ооцитов	5-7	1-2	8-12	1-2
2	Продолжительность созревания, час	9-12	25	40	40

При сперматогенезе у многих животных мейоз начинается на более поздних стадиях развития, чем при оогенезе.

Созревание ооцитов у млекопитающих приурочена к моменту половозрелости. Ооциты возобновляют мейоз, находясь в антральных фолликулах незадолго до овуляции в конце фолликулярной фазы эстрального цикла (овариальный цикл). Продолжительность созревания ооцитов у коров и свиней составляет приблизительно 40 час, у овец и коз – 25 час. (табл. 10.4.).

4. Период формирования (сперматозоид). Этот период характерен только для сперматогенеза и является завершающим периодом развития, в ходе которого округлая клетка – сперматид – приобретает морфологические свой-

ства, характерные для сперматозоида. В ходе формирования светлое округлое ядро сперматиды постепенно уплотняется, становится овальным и перемещается к плазмолемме, т.е. к той части клетки, которая, в дальнейшем, становится ее передним концом. Комплекс Гольджи перемещается к ядру и продуцирует уплотненную гранулу – акробласт. Последний увеличивается в размере и в виде чехлика охватывает ядро сперматиды – будущую головку сперматозоида.

В средней зоне акробласта из мельчайших зерен формируется акросома. Это уплотненное тельце, богатое ферментом гиалуронидазой. К противоположному от ядра полюсу перемещается центросома, в которой различают проксимальную и дистальную центриоли. При этом они располагаются по длине оси клетки так, что одна из них (дистальная) оказывается дальше от ядра, чем другая (проксимальная). Из дистальной вырастает жгутик, который выходит из клетки и превращается в осевую нить хвоста, а проксимальная при оплодотворении попадает в зиготу и принимает участие в ее делении. Участок цитоплазмы, ограниченный центриолями, образует шейку.

Дистальная центриоль делится на две части: переднюю и заднюю. От передней части дистальной центриоли отрастает осевая нить хвостика, состоящая из микротрубочек. Задняя часть дистальной центриоли приобретает вид колечка. Она, сползая по осевой нити хвостика и увлекая за собой цитоплазму сперматиды, содержащую митохондрии и гликоген, располагается на границе между начальным и главным отделами хвостика сперматозоида. Смещаясь по хвостик, цитоплазма таким слоем “одевает” главную его часть. Клетка продолжает удлиняться и приобретает форму сперматозоида. Разнообразие форм у сперматозоидов вызывается некоторыми различиями в процессе формирования из сперматид.

10.5. Фолликулогенез и овуляция

Биологическая особенность оогенеза сводится к тому, что развитие ооцитов происходит внутри фолликула. Именно фолликулярные клетки обеспечивают полноценное созревание ооцитов.

При фолликулогенезе различают три стадии развития: первичное (преантральное развитие), вторичное (антральное развитие) и третичное (Граафовое развитие). Процесс созревания фолликула и механизм его гормональной регуляции представлен на рисунке 10.4.

Преантральное развитие. Внутри фолликула содержится ооцит на стадии диплономы профазы I мейоза, а снаружи – слой зернистых клеток с рецепторами к ФСГ, окруженный теком. В преантральном развитии различают раннюю, среднюю и позднюю стадии:

1. На ранней стадии (примордиальный фолликул) блокированный ооцит еще не полностью покрыт зернистыми клетками уплощенной формы. Ооцит впервые устанавливает связь с фолликулярными клетками в конце зародышевого развития, когда он находится на ранних стадиях профазы I мейоза. К этому времени ооцит вступает в стадию диплономы мейоза. Важная особенность, на которую необходимо обратить внимание, это то, что для образования вокруг ооцита первых фолликулярных клеток, ооцит блокирует свое соб-

ственное развитие лишь для того, чтобы "сконцентрировать" репродуктивную систему на фолликуле (первое блокирование в оогенезе).

2. На средней стадии развития ооцит полностью покрывается зернистыми клетками, которые приобретают кубическую форму. После того, как вокруг ооцита завершается образование первого слоя фолликулярных клеток, начинается формирование прозрачной клеточной оболочки – *zone pellucid* (ZP). Самые ранние стадии развития первичных фолликулов (вплоть до образования нескольких слоев фолликулярных клеток) происходит без участия половых гормонов. До диаметра 0,4 мм фолликул растет медленно, затем его рост ускоряется и достигает максимума при диаметре 0,7 мм.

3. На поздней стадии развития ооцит покрывается двумя слоями зернистых клеток, внутри которых образуются рецепторы к ФСГ, а снаружи – тека. У самок млекопитающих изменение модели рецепторов гонадотропина связано с созреванием фолликула. Зернистые клетки мелких фолликулов (меньше 0,7 – 0,8 мм в диаметре) могут связывать ФСГ.

Предантрумный фолликул (фолликул без антрума) имеет много слоев зернистых клеток, его размеры в диаметре колеблются от 0,8 до 2 мм. Для этой стадии характерно увеличение размера ооцита и размножение зернистых клеток. В яичниках фолликулов второго порядка обычно в 2 раза больше, чем третьего. ФСГ связывается со специфическими рецепторами зернистых клеток и в присутствии эстрадиола-17 β стимулирует образование антрума и приобретение зернистыми клетками рецепторов ЛГ.

Мелкие фолликулы у самок приобретают рецепторы ЛГ в текальном слое клеток вслед за рецепторами ЛГ в зернистых клетках. Опыты на крысах позволяют предположить, что первоначальное появление рецепторов ЛГ в зернистых клетках стимулируется действием эстрадиола и ФСГ. Однако после того как разовьется антральный фолликул, количество рецепторов ЛГ в зернистых клетках заметно возрастает, что, вероятно, стимулируется гонадотропинами. Аналогичная модель роста фолликула у овец наблюдается в течение фолликулярной фазы, когда уровень периферического эстрадиола и ЛГ возрастает. Количество рецепторов ЛГ существенно увеличивается как в текальных, так и в зернистых клетках вслед за значительным уменьшением или сниженной регуляцией после пика предовуляторной волны гонадотропина.

Слой текальных клеток является источником фолликулярных андрогенов, а для секреции эстрогена требуется взаимодействие текальных и зернистых клеток. Мелкие антральные фолликулы с рецепторами ЛГ в текальных клетках обладают ограниченной способностью секретировать эстрадиол. Но это не объясняется недостатком андрогенов, поскольку концентрация тестостерона в антральной жидкости и секреция тестостерона *in vitro* высокие. Следовательно, когда фолликулы не растут, они приобретают рецепторы ЛГ в зернистых клетках, а также способность превращать большие количества андрогена в эстроген.

Как видно из рисунка 10.4, после того, как растущий фолликул достигает определенного размера (первичный фолликул), он становится доминирующим. Дальнейшая судьба фолликула зависит от стадии полового цикла и гор-

мональной ситуации в организме: он может овулировать с высвобождением ооцита или подвергаться атрезии. Развитый крупный фолликул, имеющий полный набор рецепторов (в том числе и рецепторы к ЛГ), секретирует в кровь гормон эстрадиол. Последний секретирруется фолликулом в кровь и в полость фолликула, способствуя его дальнейшему созреванию.



Рисунок 10.4. Схема фолликулогенеза. 1 – ооцит; 2 – зернистый слой; 3 – тека; 4 – антрум; Т – тестостерон; Э – эстрадиол; а – рецепторы к ФСГ; б – рецепторы к ЛГ. Тестостерон выделяется в первичном фолликуле на периферию, а в последующих стадиях – и в полость антрума; эстрадиол – как в полость антрума, так и на периферию.

Антральное развитие (вторичный фолликул) – это фолликул с антрумом, внутри которого содержится ооцит на стадии пахинемы профазы I мейоза. Ооциты возобновляют мейоз в метафазе I, находясь в антральных фолликулах. При антральном развитии фолликула различают две стадии: формирования и созревания антрума. Антральный фолликул – это фолликул, в полости которого содержится антрум.

Следующий шаг в развитии фолликула состоит в формировании между слоями зернистых клеток полости (*antrum*), заполненной жидкостью. Содержащую в полости жидкость называют фолликулярной жидкостью. Вначале она образуется за счет секреции зернистых клеток (стадия формирования антрума), но затем большую ее часть составляет экссудат, выделяющийся из капилляров по другую сторону зернистой мембраны (стадия созревания антрума). Для прохождения этих стадий необходимы гонадотропный гормон гипофиза ФСГ и эстрогены, вырабатываемые в самом фолликуле. ФСГ воздействует на соответствующие рецепторы клеток зернистого слоя фолликула и, в присутствии эстрадиола, стимулирует образование в фолликуле антрума и возникновение рецепторов к ЛГ, сначала в клетках теки, а затем в клетках зернистого слоя. Образование антрума начинается, когда диаметр фолликулов достигает от 2 до 2,5 мм. После того, как фолликул достигает 2 мм, скорость роста начинает снижаться и у преовуляторного фолликула прекращается полностью.

Графов фолликул – это фолликул, внутренняя полость которого содержит большой антрум и ооцит на стадии метафазы II мейоза.

Стимулированный гормонами фолликул быстро увеличивается в размерах, превращаясь в **третичный фолликул**. Этот фолликул перемещается к поверхности яичника, содержание в нем фолликулярной жидкости возрастает.

тает, в результате чего он выступает над поверхностью яичника и, находится в ожидании сигнала к овуляции.

Верхушка выступающего наружу фолликула носит название *стигмы* и, спустя сутки после того, как содержание ЛГ в крови достигает максимума, в этой области возникает ряд характерных изменений, наиболее важным из которых является вторичное блокирование в ооците мейоза на стадии метафазы II (Графов фолликул). Хотя объем фолликулярной жидкости существенно увеличивается, внутрифолликулярное давление перед разрывом не возрастает.

При Граафовом развитии различают две стадии:

1. Предовуляторная стадия. Диаметр фолликулов колеблется от 2,5 – 3,0 мм до 1,0 – 1,8 см. Образовавшийся антрум среднего размера. Большая часть эстрадиола в периферической циркуляции крови овец в фазе желтого тела и фолликулярной фазе поло-вого цикла секретруется яичниками с большим Граафовым фолликулом. Установлено, что фолликулу требуется приблизительно 24 дня, чтобы вырасти от стадии фолликула второго порядка до предовуляторной фазы.

2. Овуляторная стадия. Фолликул с большим антрумом, истонченной стенкой, готовый к овуляции в диаметре от 3,0 мм до 1,0 – 2,8 см.

Такой фолликул имеет полный комплект зернистых клеток, рецепторы ЛГ в текальных и зернистых клетках и обладает способностью превращать андрогены в эстрогены, а также овулировать, если подвергнется действию волны гонадотропина.

Непосредственно перед овуляцией фолликул вырабатывает большое количество эстрадиола. Как в клетках оболочки фолликула, так и в зернистых клетках имеется очень много ЛГ - рецепторов, а в зернистых клетках содержатся также ФСГ – рецепторы.

В момент овуляции происходит быстрый выброс фолликулярной жидкости вместе с яйцом, окруженным лучистым венцом из фолликулярных клеток.

Период между началом охоты и временем предовуляторного пика ЛГ колеблется от 6 до 18 час. Овуляция наступает примерно через 24 часа после пика ЛГ. Сам пик ЛГ длится 8 - 12 часов.

Таким образом, для оогенеза характерной особенностью является то, что блокирование наступает дважды: первое, когда ооциту нужно “войти в фолликул” (начало фолликулогенеза), второе, когда ооциту нужно “выйти из фолликула” (овуляция).

Овуляция. Когда содержание в крови ЛГ, ФСГ и эстрогена достигает наивысшего уровня, стимулируется прохождение конечных стадий созревания фолликула, что приводит к овуляции (рис. 10.4.). Размеры фолликула продолжают увеличиваться в результате роста самого фолликула и дальнейшего накопления фолликулярной жидкости.

В момент овуляции происходит быстрый выброс фолликулярной жидкости вместе с яйцеклеткой, окруженной лучистым венцом из фолликулярных клеток.

В момент овуляции масса яйценосного бугорка медленно выделяется из фолликула вместе с некоторым количеством довольно вязкой фолликулярной жидкости.

Изменения в стенке фолликула, предшествующие ее разрыву, вызваны выделением коллагеназ. Кроме того, под стигмой (обнаружено у кроликов) происходит значительное увеличение числа лизосом. ЛГ стимулирует выработку простагландина E_{26} и простагландина F_{26} (нестероидные гормоны) клетками предовуляторного фолликула. E_{26} стимулирует высвобождение коллагеназ из клеток выстилки фолликула.

Гранулярные клетки вырабатывают также протеолитический фермент - активатор плазминогена, синтез которого стимулируется ФСГ. Все эти изменения приводят к разрушению соединительной ткани фолликулярной стенки. Следовательно, под действием ЛГ в предовуляторном фолликуле происходит увеличение синтеза прогестеронов и простагландинов. Кроме того, ЛГ стимулирует выделение гистамина из тучных клеток. Все перечисленные гормоны необходимы для нормального протекания овуляции.

Итак, последние события, предшествующие овуляции начинаются с гомеостаза в области стигмы, которая разрывается примерно через час. Происходит быстрый выброс фолликулярной жидкости вместе с яйцом, окруженным лучистым венцом из фолликулярных клеток.

Точный механизм, способствующий разрыву овариального фолликула, до сих пор еще не вполне понят. По всей вероятности, в нем участвуют несколько факторов. Согласно одной из гипотез, разрыв стенки фолликула происходит в результате снижения ее прочности, вследствие нарушения местного кровоснабжения или локального действия литических ферментов, стимулируемых гормонами гипофиза (ЛГ). После того, как было установлено, что клетки стромы яичника обладают свойствами гладких мышечных клеток, возникло предположение о возможной роли их сократительной активности в разрыве стенки фолликула. В настоящее время имеющиеся гипотезы не дают адекватного объяснения всем событиям, которые происходят при овуляции.

В качестве заключения, можно утверждать, что для успешной овуляции необходимы следующие биохимические факторы:

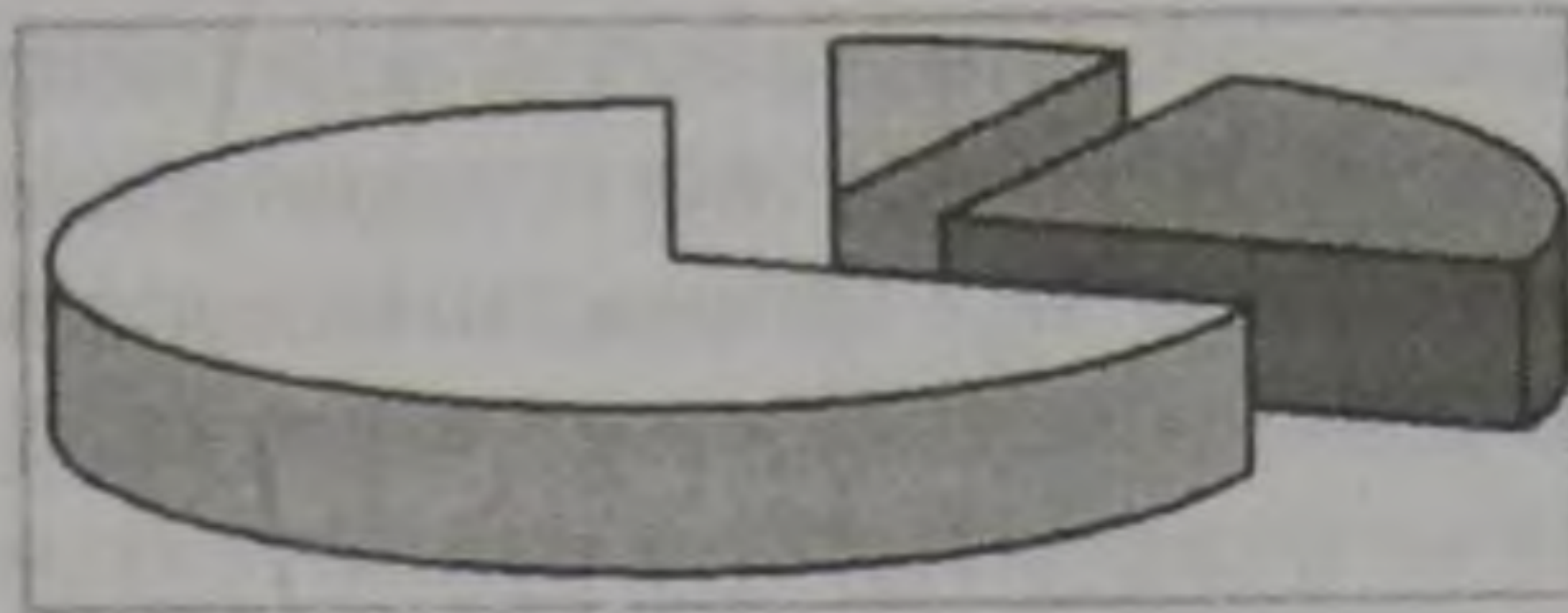
1. Соотношение ФСГ к ЛГ в крови должно быть 1:10.

2. Необходимо наличие двух дополнительных гормонов, таких как *простагландин F_{26}* (стимулирует высвобождение коллагеназ из клеток выстилки фолликула) и *гистамин* (обеспечивает выброс фолликулярной жидкости). Первый синтезируется фолликулярными, а второй – тучными клетками.

3. Фермент активатор *плазминоген*, который способствует разрушению соединительной ткани фолликулярной стенки (синтезируется гранулезными клетками).

Желтое тело формируется после овуляции из клеточных компонентов фолликула. Нормальное желтое тело образуется только в том случае, если в фолликуле имеется достаточное число гранулезных клеток с большим числом рецепторов для ЛГ.

При разрыве овариального фолликула большая часть содержащегося в ней жидкости выходит наружу, а строма яичника сокращается, в результате чего полость фолликула уменьшается. Кровь, вытекающая из мелких сосудов, поврежденных при разрыве фолликула, может частично заполнить полость, образуя вместе с остатками содержимого фолликула сгусток.



□ 1 тип □ 2 тип □ 3 тип

Рисунок 10.5. Три типа желтых тел: 1 тип – желтое тело диэструса; 2 тип – желтое тело псевдобеременности; 3 тип – желтое тело беременности.

Превращение разорвавшегося фолликула в желтое тело сопровождается также рядом других изменений. Зернистые клетки набухают и приобретают цитологические признаки клеток, секретирующие стероидные гормоны. Центральный сгусток уменьшается в результате деятельности фагоцитов, а зернистый слой, который прежде был лишен сосудов, становится сильно васкуляризованным. Кровеносные сосуды приносят с собой из оболочки фолликула мелкие клетки, которые располагаются среди более заметных клеток зернистого слоя. У моноовуляторных видов (человек) овуляция происходит случайным образом в том или ином яичнике. Имеются, по меньшей мере, два типа лютеоцитов (клеток желтого типа) – крупные и мелкие (у человека имеется 3 тип – К-клетки). Увеличение массы желтого тела после овуляции связано, в основном, с увеличением размеров лютеоцитов (гипертрофия), а не с увеличением их числа (гиперплазия). Таким образом, в желтом теле примерно столько же клеток, сколько имелось в предовуляторном фолликуле. Итак, желтое тело, названное так потому, что на нефиксированном материале оно имеет желтую окраску, состоит из соединительной ткани, лютеиновых клеток, фибрина кровяного сгустка, а также из свернувшейся крови.

Различают три типа желтых тел (рис. 10.5.):

- желтое тело диэструса - малоактивное и короткоживущее, образуется после овуляции, при отсутствии беременности;
- желтое тело псевдобеременности - более активное и имеющее большую продолжительность жизни, образуется после стерильного спаривания;
- желтое тело беременности – имеет наибольший период жизни и наибольшую активность.

Гормональные взаимодействия у разных видов млекопитающих протекают по-разному. Но необходимыми условиями для образования желтого тела являются наличие ЛГ и пролактина. Желтое тело вырабатывает прогестерон. Одна из главных функций прогестерона заключается в подготовке слизистой оболочки матки к приему и имплантации оплодотворенного яйца. Если беременность не возникает, то желтое тело постепенно теряет чувствительность к гонадотропным гормонам гипофиза, что возможно вследствие утраты его клетками ЛГ - рецепторов, а затем претерпевает обратное развитие. Так, желтое тело у овец достигает полной секреторной активности на 6 - 8 день полового цикла и продолжает выделять прогестерон на почти постоянном уровне до 15-го дня цикла, и снижается за 1 - 2 дня до начала сле-

дующей охоты. Наибольшая концентрация прогестерона в фазу желтого тела на 6 - 8 день составляет 2 - 2,5 нг/мл. Уменьшение прогестерона в крови происходит примерно на 15 день цикла. Если же беременность наступает, то у желтого тела начинается продолжительный период роста. Кроме того, при беременности в желтом теле синтезируются два полипептидных нестероидных гормонов - это *релаксин*, который способствует сохранению беременности, снижая сократимость матки и *окситоцин*, который секретируется в вену яичника, обеспечивая выработку эстрогена, что необходимо для "защиты" беременности (см. табл. 6.6; глава 6). Сохранение желтого тела беременности обеспечивается хорионическим гонадотропным гормоном, секретлируемым клетками зародыша и окружающими его оболочками.

Изменения, происходящие при дегенерации желтого тела того или другого типа, носит характер фиброзной инволюции, это означает, что клеточные структуры разрушаются, а на их месте развивается волокнистая соединительная ткань. По мере старения и уплотнения этой ткани она постепенно приобретает беловатую окраску, характерную для рубцовой ткани, получая название беловатого тела.

В зависимости от существования желтого тела диэструса различают три класса животных. К первому классу относятся животные (собаки), у которых период существования желтого тела вне беременности примерно такой же, как при беременности. Ко второму классу относят животных (приматы, копытные, грызуны), у которых при беременности желтое тело живет больше, чем вне беременности (это связано с тем, что плацента обладает выраженной лютеотропной активностью). Если же желтое тело цикла существует более продолжительное время, чем желтое тело беременности, то таких животных относят к третьему классу (мелкие сумчатые).

10.6. Атрезия фолликула

Большинство фолликулов в яичниках самок млекопитающих становятся *атретическими*. Так, у ряда пород овец признаки атрезии редко заметны в преантральных и антральных фолликулах диаметром менее 1 мм, но примерно у 2/3 фолликулов размером от 1,5 до 2,5 мм уже видны признаки атрезии. Атрезия антральных фолликулов происходит во всех стадиях цикла яичника, а также и в фолликулярную фазу полового цикла незадолго до овуляции.

Наиболее структурное раннее изменение в атретическом фолликуле - это появление пикнотических ядер и снижение митотической активности зернистых клеток, смежных с антральной полостью. Деградация клеток *интерны теки* становится заметной в третичной стадии атрезии.

В период роста фолликулы проходят андроген доминантную фазу (диаметр фолликула 2-3 мм), во время которого их способность превращать андрогены в эстрогены ограничена. Характерной особенностью стероидной продукции в атретических фолликулах является высокий уровень образующегося андрогена при снижении продукции эстрадиола. Это позволяет предположить, что поскольку андроген секретируется в первую очередь текальными клетками, то секреция в меньшей степени связана с атрезией, чем синтез эстрогена в зернистых клетках. Однако сопоставление общей продукции стероидов в атретических и неатретических фолликулах показывает, что даже в больших атретических фолликулах продукция андрогена уменьшается на 50%. Уменьшение продукции эстрадиола, хотя андроген при этом присутствует в достаточном коли-

честве, означает, что потеря активности *ароматазы* является ранним признаком в дегенеративных изменениях атретических фолликул. Рядом исследователей было постулировано, что превращение андрогенов в эстроген и реакция зернистых клеток на эти стероиды служат ключевыми факторами в определении того, будет ли фолликул овулировать, или станет атретичным.

10.7. Физиологические предпосылки для оплодотворения гамет

Для зарождения нового индивида необходимым условием является слияние яйцеклетки со сперматозоидом, в результате которого происходит объединение наследственных материалов родителей. Оплодотворение гамет происходит в гениталиях самки животных, а точнее – в ампуле фаллопиевой трубы.

Для продления рода биологические “интересы” самки и самца направлены к созданию благоприятных условий для осуществления гаметами акта оплодотворения. Физиологическими предпосылками оплодотворения являются:

1) акт совокупления, который необходим для поступления сперматозоидов в репродуктивный тракт самки животных;

2) двигательная активность сперматозоидов, которая необходима для поступления сперматозоидов в ампулу фаллопиевой трубы;

3) отбор сперматозоидов, обеспечивающий рождение биологически полноценного индивида (преодоление сперматозоидами препятствий);

4) гормональный статус самки в период эструса необходим гаметам для приобретения оплодотворяющей способности (для сперматозоидов – это реакция капацитации, для яйцеклеток – овуляция).

Перемещение гамет к месту оплодотворения. Только что овулировавшая яйцеклетка, окруженная лучистым венцом, свободно лежит в брюшной полости. Бахромка яйцепровода у коров, свиней и овец во время овуляции близко прилегает к яичнику, а у кобыл и мелких грызунов яичник окружен оболочкой в виде сумки. Было показано, что при движении ресничек яйцеклетка буквально “стаскивается” с поверхности овулировавшего фолликула и быстро “проталкивается” в ампулу. Но реснички обеспечивают продвижение яйцеклетки лишь в том случае, если она окружена клетками яйценосного бугорка. Следовательно, условия, способствующие передвижению яйцеклетки к месту оплодотворения (ампула у приматов и соединение ампулы с истмусом - у домашних животных) следующие:

1. Взаимодействие между яйцеклеткой, окруженной фолликулярными клетками и ресничками, которые густо покрывают внутреннюю поверхность бахромчатой воронки. В период овуляции активность ресничек регулируется стероидными гормонами.

2. Постоянные колебания яичников по направлению к бахромчатой воронке. Причиной этих движений является повышенная мышечная активность поддерживающих брыжеек.

3. Волнообразные сокращения гладких волокон мышечной оболочки яйцепровода (эта оболочка состоит из отдельных слоев кольцевых и продольных мышечных волокон).

“Продвижение” яйцеклетки не является постоянным, оно скорее состоит из серии прерывистых коротких толчков, совпадающих с волнами сокращений в ам-

пуле. Активность гладких мышц зависит от концентрации стероидных гормонов яичника, при этом сила сокращений усиливается с приближением овуляции.

Исходя из этих условий, яйцеклетка к месту оплодотворения поступает в течение нескольких минут, например, у кошек и крольчих на это требуется 6 - 15 мин, у свиней - 45 мин. При перемещении в яйцеклетке происходит деполимеризация и разрыхление оболочек яйцеклетки, рассредоточение клеток яйценосного бугорка, морфологическая перестройка клеток лучистого венца.

Сперматозоиды в половой тракт самки поступают во время полового акта. Содержимое, выделяемое самцом во время коитуса (акта совокупления) называется эякулятом. Сперма - это жидкость, продуцируемая при эякуляции, которая состоит из сперматозоидов, секретов придатка семенника и придаточных половых желез. Содержимое добавочных желез вводится в момент эякуляции сильными сокращениями, что облегчает смешивание сперматозоидов с семенной плазмой в тазовой уретре перед выделением спермы в гениталии самок и обеспечивает начальный стимул подвижности сперматозоидов.

У плацентарных млекопитающих сперма во время спаривания попадает как во влагалище (кролики, жвачные, приматы), так и в матку через канал шейки матки (свиньи, лошади, собаки, грызуны).

При продвижении по женскому половому тракту сперматозоиды преодолевают несколько препятствий, поэтому их число по мере продвижения прогрессивно уменьшается (рис. 10.6; табл. 10.5.).

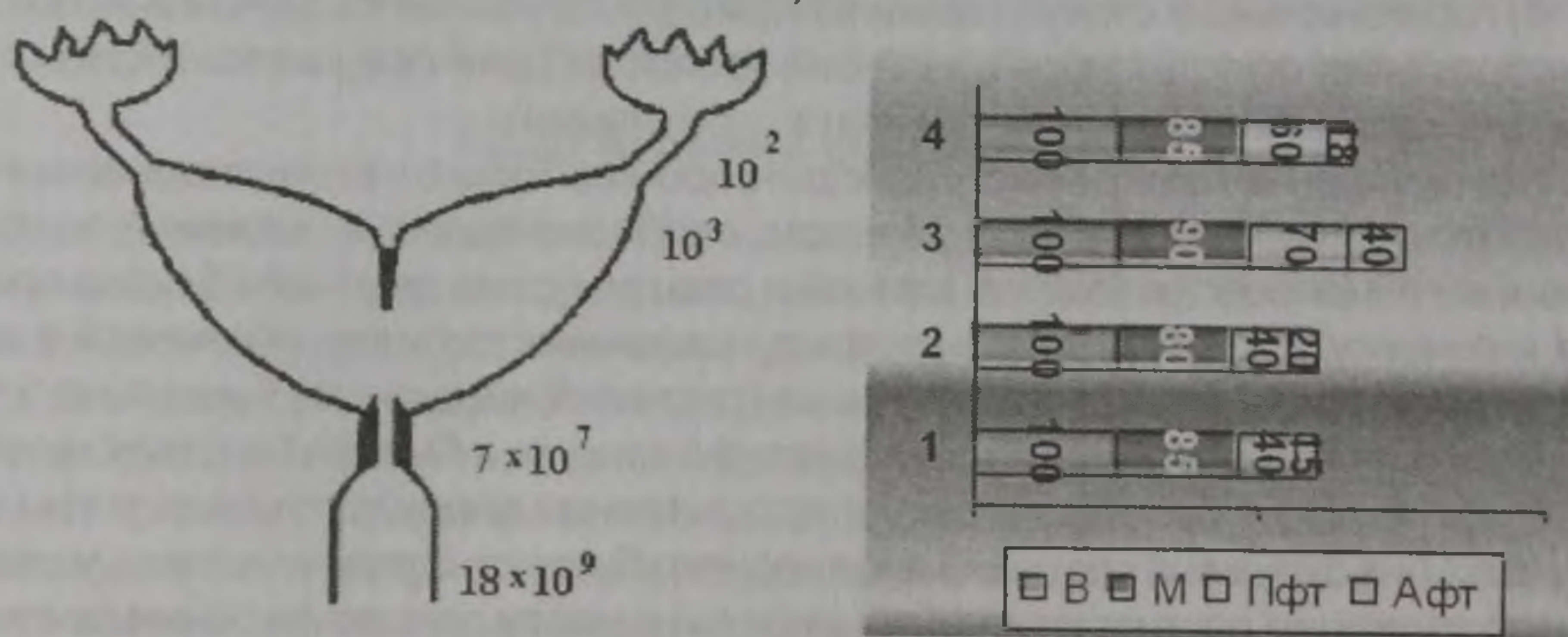


Рисунок 10.6. Транспорт сперматозоидов в половых путях самок животных (усредненные показатели).

1. В среднем по основным видам сельскохозяйственных животных: 1) влагалище - 2-18 млрд.; 2) матка - 0,9-7 млрд.; 3) перешеек фаллопиевой трубы - 0,8-1 млрд.; 4) ампула яйцепровода - 100-800 тыс. сперматозоидов.

2. Преодоление препятствий (В -- влагалище; М -- матка, Пфт -- перешеек фаллопиевой трубы, Афт -- ампула фаллопиевой трубы) и число сперматозоидов (в %) по мере продвижения в органах репродукции самок животных (1 - корова, 2 - овцематка, 3 - свиноматка, 4 - кобыла).

Первое препятствие на пути у сперматозоидов связано с естественной кислотностью верхней части влагалища. Функция этой кислотности - создать бактериостатическую среду. Приблизительно через 5 - 10 сек. после коитуса pH влагалища возрастает от 4,3 до 7,2. Влагалищную трубу сперматозоиды проходят при-

мерно за 30 мин со скоростью передвижения 1,5 – 4 мм в минуту (фаза быстрого перемещения сперматозоидов).

Далее следует медленная фаза перемещения, т.е. когда сперматозоиды плавательным движением проникают в шейку матки. Здесь многие сперматозоиды оседают в многочисленных криптах канала шейки матки. Обычно канал шейки матки заполнен густой шеечной слизью, в которой во время овуляции под действием гормонов происходит снижение вязкости этой слизи, что облегчает проникновение сперматозоидов (второе препятствие).

Таблица 10.5. Объем и концентрация сперматозоидов в эякуляте и в ампуле яйцепровода у сельскохозяйственных животных

Видовая принадлежность	Объем эякулята, мл (min-max)	Количество сперматозоидов в эякуляте (min-max)	Место эякуляции	Количество сперматозоидов в ампуле яйцепровода, тыс.
Бык	4 – 8	4 – 14	Влагалище	100 – 300
Баран	0,8 – 1,5	2 – 4	Влагалище	600 – 700
Хряк	150 – 500	40 – 50	Матка	1000
Жеребец	30 – 100	3 – 15	Матка	400 – 700

Следующий барьер (третье препятствие) статистическая погрешность на пути сперматозоидов - это вход в фаллопиевы трубы. Здесь сперматозоиды перемещаются за счет собственной активности и в результате действия мышечных сокращений стенок маточной трубы и тока жидкости. Только в верхнем конце маточной трубы движение самих сперматозоидов приобретает большое значение, т.к. они двигаются против слабого тока жидкости (четвертое препятствие), проявляя так называемый *положительный реотаксис*.

Оплодотворяющая способность гамет. Продолжительность оплодотворяющей способности гамет представлено в таблице 10.6.

Как видно из таблицы, овулировавшие яйцеклетки после нескольких часов (максимум 24 часа) подвергаются дегенерации, это объясняется тем, что яйцеклетки после овуляционного периода находятся под влиянием возрастающей секреции прогестерона из развивающегося желтого тела. В противоположность этому, у сперматозоидов оплодотворяющая способность может сохраняться до 24 - 48 часов, а их подвижность - до 4 суток.

Таблица 10.6. Оплодотворяющая способность гамет, час

Гамета	Видовая принадлежность			
	Крупный рогатый скот	Овцы	Свиньи	Лошади
Яйцеклетка	10 – 16	10 – 20	8 – 22	До 24
Сперматозоид	24 – 48	24 – 48	24 – 42	24 – 56

Следует отметить, что оплодотворяющая способность сперматозоидов бывает продолжительнее в предовуляторной среде. Самую высокую плодот-

витость получают при осеменении за 12-16 ч. до овуляции, а при использовании разбавленной или замороженной спермы - за 6-8 ч. до овуляции.

10.8. ОПЛОДОТВОРЕНИЕ ГАМЕТ IN VIVO

Оплодотворение гамет — это процесс слияния сперматозоида с яйцеклеткой, который приводит при кариогамии к зарождению нового индивида путем образования зиготы. При оплодотворении условно различают три периода: сближение гамет, активация и кариогамия.

Сближение гамет. Сближение сперматозоида с яйцом обеспечивается совокупностью следующих факторов, повышающих вероятность их столкновения: одновременность наступления стадии готовности к оплодотворению, избыточная продукция сперматозоидов по сравнению с числом женских половых клеток и крупные размеры яйцеклетки.

Видовая принадлежность	Время, час	Видовая принадлежность	Время, час
Бык	5 – 6	Хряк	2 – 3
Баран	1 – 1,5	Жеребец	8 – 12

Яйцеклетки и сперматозоиды вырабатывают гамоны, которые необходимы для оплодотворения. Гамоны - это химические вещества, косвенно участвующие в обеспечении их сближения и взаимодействия. Различают два типа гамонов: гиногамоны - это гамоны яйцеклеток и андрогамоны - гамоны сперматозоидов.

Почти у всех позвоночных встреча яйцеклетки и сперматозоида - дело случая. После коитуса сперматозоиды подвергаются воздействию со стороны тканей женского полового тракта.

Этап	Общая характеристика
1	Локальное слияние отдельных участков наружной акросомной мембраны с покрывающей ее плазматической мембраной сперматозоида.
2	Высвобождение веществ акросомы из-за нарушения слившихся участков. Происходит отторжение хвоста или его части.
3	Растворение яичевой оболочки в области контакта яйца со сперматозоидом. Под действием <i>гиалуронидазы</i> сперматозоид проходит через лучистый венец, кроме того, этот фермент способствует рассеиванию венчика фолликулярных клеток (<i>corona radiate</i>) и растворению оболочки яйца. Под действием <i>акрозина</i> (в сперматозоидах находится про-акрозин, который активизируется при акросомной реакции) и <i>зонализина</i> (Д, Е) сперматозоид проходит через <i>zone pellucid</i> . Кроме того, в акросоме было выделено вещество, ответственное за видоспецифическое связывание сперматозоидов с вителлиновым слоем (белок с молекулярной массой около 30000 и получившее название байндина). Прикрепившись к ZP-3, сперматозоид начинает проникать в яйцеклетку под углом 45 градусов. Время проникновения, в среднем, составляет 5-10 мин.

1	2
4	Сперматозоид попадает в перивителлиновое пространство, который находится между ZP и плазматической мембраной яйца. Происходит быстрый контакт, что ведет к образованию бугорка оплодотворения.
5	Плазматические мембраны сливаются, образуется цитоплазматический мостик и происходит <i>плазмогамия</i> - объединение цитоплазм обеих гамет. Затем по цитоплазматическому мостику переходит ядро и центриоль сперматозоида.
6	Встраивание мембраны сперматозоида в мембрану яйцеклетки. После слияния сперматозоида с яйцеклеткой головка сперматозоида быстро теряет оболочку, и хроматин начинает деконденсироваться. В это время в данном участке яйцеклетки происходят изменения организации субкортикального слоя, захватывающие цитоскелет и приводящие к появлению так называемого бугорка (конуса) оплодотворения, после чего теряется система микроворсинок. Это обусловлено действием хроматина сперматозоида на молекулы актина, которые из растворимой формы (α -лактин) переходят в полимеризованную форму (β -лактин), образуя скопление микрофиламентов в субкортикальном районе, граничащим с деконденсирующей головкой сперматозоида.

Природа воздействия остается неясной, но оно облегчает проникновение сперматозоида через яйцевые оболочки. Это явление называют капацитацией сперматозоидов (табл. 10.7.) и у многих видов животных при его отсутствии оплодотворения не происходит.

Капацитация – это реакция, благодаря которой сперматозоиды в гени- талиях самки приобретают оплодотворяющую способность (под влиянием секретов, вырабатываемых стенками яйцеводов, матки и влагалища).

Оплодотворяющая способность сперматозоида определяется возможно- стью его проникновения через яйцевую оболочку яйцеклетки. После прохожде- ния сперматозоидом через клетки лучистого венца и *zone pellucid* он вступает в контакт с плазматической мембраной яйцеклетки. Для успешного оплодотво- рения сперматозоиду необходимо пройти через акросомную реакцию, необхо- димой предпосылкой которого, в свою очередь, служит реакция капацитации.

Необходимость капацитации было доказано при попытках оплодотво- рения ооцитов *in vitro*. Было установлено, что только что выделенные спер- матозоиды практически лишены оплодотворяющей способности, а инкуби- рование их с тканями полового тракта самки в течение нескольких часов спо- собствует появлению оплодотворяющей способности.

При капацитации сперматозоид претерпевает следующие изменения: 1) происходят существенные изменения белковых компонентов клеточной поверхности сперматозоидов, что способствует, в дальнейшем, выделению литических ферментов при акросомной реакции; 2) возрастает их двигатель- ная активность (гиперактивация).

Время, необходимое для капацитации сперматозоидов, варьирует от 1 часа у мышей до 5 - 6 часов у приматов (табл. 10.7.).

В норме акросомная реакция (табл. 10.8.) начинается, когда сперматозоид вступает в контакт с клетками кумулюса. Морфологическим выражением акросомной реакции является слияние наружной акросомной и плазматической мембран сперматозоида во фронтальной половине головки. Акросомная реакция сводится к очень быстрым изменениям (10 - 20 сек.) в акросомном аппарате головки сперматозоида, приводящим к высвобождению ферментов акросомной гранулы и выбрасыванию акросомной нити в сторону поверхности яйца. В результате акросомной реакции у сперматозоида происходит приток ионов кальция, отток ионов водорода в обмен на ионы натрия. Обусловленное этим повышение рН в головке сперматозоида приводит к формированию акросомального отростка (образуется только при слиянии двух мембран) в результате «взрывной» полимеризации актина.

Активация яйцеклетки. Активация яйцеклетки происходит после четвертой стадии акросомной реакции. Стимулом служит прикосновение сперматозоида к поверхности яйца. Все изменения, возникающие после активации делят на первичные, вторичные и третичные.

Первичные изменения. После встраивания мембраны сперматозоида в мембрану яйцеклетки в последнюю начинают поступать ионы натрия, в результате мембранный потенциал яйцеклетки из отрицательного (-60 - -28 мВ) становится слабо положительным (+10 - +8 мВ), а затем в течении 20 мин. остается на этом уровне, что ведет к увеличению «текучести» мембраны. Основная функция данного механизма заключается в препятствии полиспермии.

Вторичные изменения. Примерно через 10 секунд после начала активации увеличивается содержание ионов кальция в цитоплазме яйцеклетки за счет его высвобождения из внутриклеточного хранилища.

Волна высвобождения Ca^{2+} является главным пусковым моментом активации. Примерно через 60 сек. концентрация ионов Ca^{2+} падает до прежнего уровня и начинается экзоцитоз кортикальных гранул.

В результате всех этих реакций, в течение приблизительно 1 минуты возникает оболочка оплодотворения, которая отделяется от поверхности цитоплазмы. Образованное при этом пространство вместе с жидкостью называют перевителлиновым пространством (рис. 10.7.).

Кроме того, параллельно с кортикальным преобразованием происходит повышение внутриклеточного рН с 6,6 до 7,2. Это изменение происходит благодаря выделению ионов H^+ , которое сопряжено с поглощением ионов Na^+ . Эти ионные сдвиги обуславливают два физиологических процесса: во-первых, яйцеклетка становится недоступной для проникновения других сперматозоидов и, во-вторых, осуществляются первые этапы запрограммированного эмбрионального развития.

Третичные изменения. Из яйцеклетки выделяется цитостатический белок, что ведет к разблокированию мейоза. В яйцеклетке, при активации, хромосомы расходятся на две группы, одна из которых переходит в состав полярного тельца, а вторая остается в яйце и образует, в дальнейшем, женский пронукле-

ус. Выделение второго полярного тельца является завершающей фазой мейоза.

Борозда деления проходит таким образом, что в состав полярного тельца попадает около 1% цитоплазмы. Размеры второго полярного тельца зависят от расположения борозды (так называемого контрактального кольца), что в свою очередь, определяется локализацией мейотического веретена.

10.9 Культивирование эмбрионов *in vivo*

Предимплантационное развитие - это период развития, при котором зигота при одновременном перемещении по репродуктивному тракту от места оплодотворения (ампула фаллопиевой трубы) до места имплантации (рог или тело матки) проходит через ряд дроблений, ведущих к образованию бластулы. Началом оплодотворения для яйцеклетки являются сутки, в которые было проведено осеменение (обычно оплодотворение наступает через 6 - 12 часов после покрытия). Эти сутки для оплодотворенной яйцеклетки являются началом эмбрионального развития, поэтому обозначаются исследователями через день "первый" (не следует путать день "один" и день "первый"; первое понятие относят к индуцированному половому циклу, второй - к началу беременности).

Зигота - это оплодотворенная яйцеклетка. Различают две стадии развития зиготы: стадия двух пронуклеусов (до кариогамии) и стадия зрелой зиготы (после кариогамии).

Одноклеточный эмбрион на стадии пронуклеусов. Формирование пронуклеусов происходит через 1,5 - 2 часа после оплодотворения.

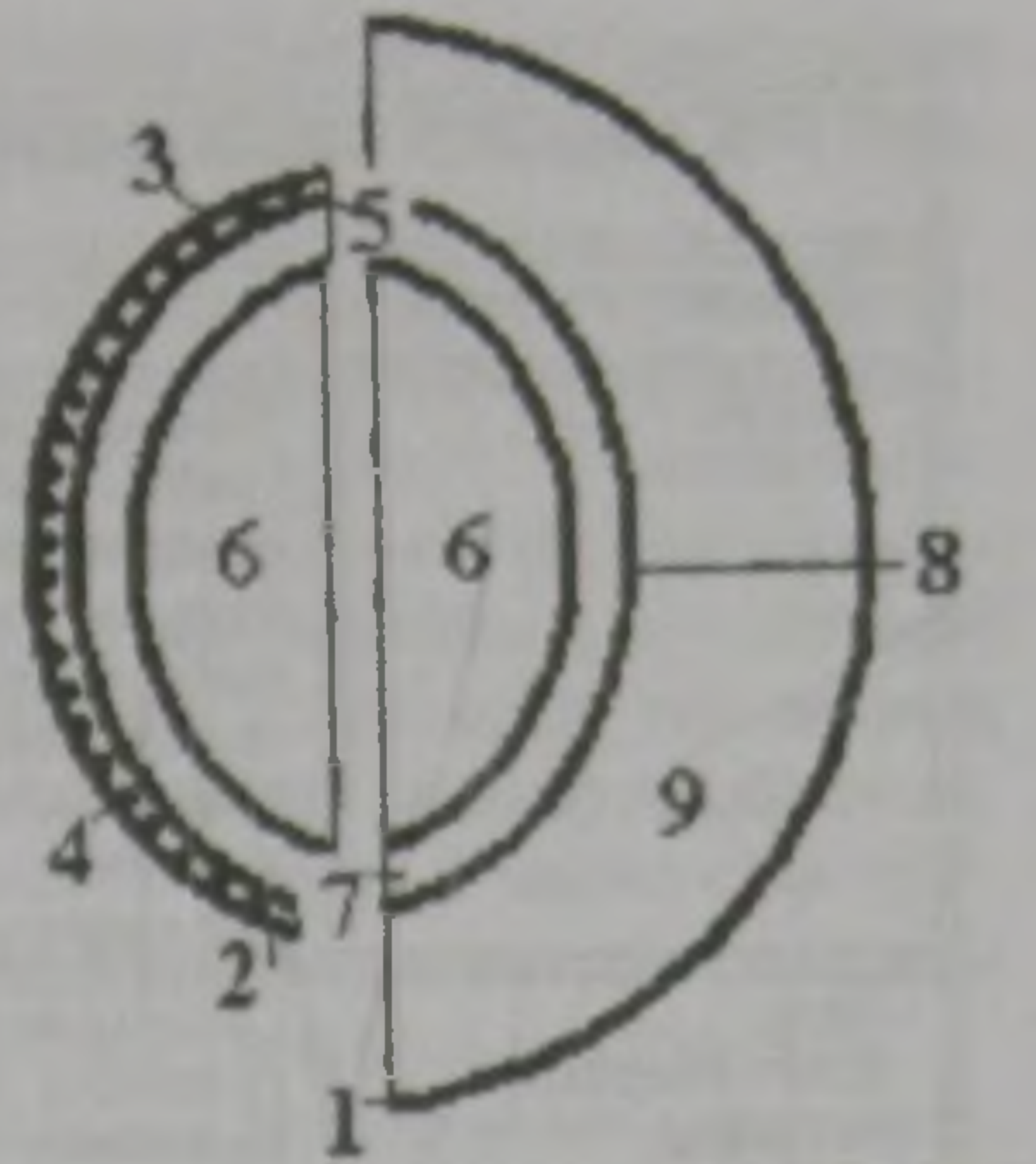


Рисунок 10.7. Упрощенная схема яйцеклетки до и после оплодотворения.

1-оболочка оплодотворения, 2-желточная оболочка, 3-кортикальные гранулы, 4-слой пигментных гранул, 5-внутренний протоплазматический слой, 6-желток, 7-экстрагранулярная зона, 8-наружная поверхность цитоплазмы яйцеклетки, 9-перевителиновое пространство.

Таблица 10.9. Стадия развития предимплантационного эмбриона

Стадия развития	Характеристика
Зигота	Формирование пронуклеусов происходит через 1,5 - 2 часа после оплодотворения. Мужской пронуклеус имеет смешанное происхождение, т.к. его хроматин происходит от сперматозоида, а оболочка - от яйцеклетки. К особенностям пронуклеусов относят: крупные размеры, малая плотность, плохая окрашиваемость ядерными красителями и наличие своеобразных структур, лишь отдаленно напоминающих ядрышки. Геном одноклеточного зародыша транскрипционно неактивен.
Двух бластомерный эмбрион	Продолжительность двух бластомерной стадии колеблется в границах от 18 до 20 - 22 часов. Ядра на ранней двух бластомерной стадии не содержат хромоцентров. На этой стадии транслируются как материнские мРНК, так и мРНК эмбриона.
Четырех - восьми бластомерный эмбрион	У эмбрионов на этой стадии развития ядра имеют такую же организацию, что и на более поздних стадиях дробления. В них заметны типичные ядрышки и хромоцентры, состоящие из блоков С - гетерохроматина. Происходит синтез всех классов РНК. Обнаруживаются генопродукты отцовских аллелей. На ранних стадиях бластомеры <i>тотипотентны</i> (при изолировании они способны развиваться в полноценный зародыш) и эмбрионы обладают высокой регуляторной способностью.
Морула	Период раннего дробления эмбриона до образования морулы является очень важным в его развитии, поскольку в это время происходит своеобразная "замена инструкции". До образования морулы эмбрион развивается по программе материнского организма - через накопленную РНК и белки. Со стадии морулы эмбрион развивается уже по собственной программе биосинтезов. Для стадии морулы характерно компактизация и поляризация. На этой стадии изменяется форма бластомеров от сферической до уплощенной в результате их компактизации, что приводит к тесному контакту между бластомерами. При нарушении компактизации бластоциста не образуется и эмбрион погибает. При поляризации происходит изменение положения ядра, перераспределение органоидов и других компонентов цитоплазмы бластомеров. Процесс поляризации служит предпосылкой для дифференциации.
Бластоциста	Эта приспособительная стадия развития, необходимая для имплантации. Бластоциста - это пузырек, состоящий из стенки (ТЭ - трофэктодерма), полости с жидкостью (бластоцель) и клеточного скопления (ВКМ - внутренняя клеточная масса) на одном из полюсов внутренней поверхности ТЭ. На стадии поздней морулы и ранней бластоцисты экспрессируются многие гены, в том числе и отцовские аллели. Показано, что преобразование морулы в бластоцисту зависит от транскрипции генетической информации во время пятого деления дробления, т.е. перехода от 16-ти к 32-х клеточной стадии развития.

Кариогамия (объединение ядерного материала обеих гамет) наступает лишь после завершения яйцеклеткой обоих делений созревания. Это последняя стадия оплодотворения.

На стадии двух пронуклеусов наследственный материал родителей находится в цитоплазме яйцеклетки еще порознь. После кариогамии, что наступает примерно, в зависимости от видовой принадлежности, через 6 - 10 часов после формирования оболочки оплодотворения, зигота переходит на стадию «зрелости», последняя длится 10 - 12 часов. В этой стадии наследственный материал полон (диплоиден) для вида. Из всего вышеизложенного следует, что период зиготы составляет примерно 24 часа, после чего наступает первое дробление.

Все события, происходящие с хромосомами в зиготе, а также сам процесс деления зиготы на две клетки, находятся под контролем цитоплазмы яйцеклетки, а именно макромолекул, которые образовались в оогенезе.

Дробление - это разделение зиготы на бластомеры. В результате ряда митотических делений, которые сначала могут проходить синхронно, зигота оказывается разделенной на большое число бластомеров (табл. 10. 9.). После чего образуется бластула, которая имеет полость (бластоцель). Образование бластулы завершает процесс дробления и непосредственно предшествует гастрюляции.

Особенностью эмбрионального развития эмбрионов в половых путях самок сельскохозяйственных животных является то, что для крупного рогатого скота и лошадей удвоение бластомеров до образования морулы происходит через каждые 24 ч., для овец и свиней - начиная с третьего цикла удвоение бластомеров происходит через каждые 12 - 16 часов. Так, если на 5 сутки после оплодотворения развивается у крупного рогатого скота ранняя морула (16 бластомерный эмбрион), то у овец к этому дню развивается уже поздняя морула (44 - 64 - бластомерный эмбрион). Поэтому большинство эмбрионов достигает стадии экспандированной бластоцисты на 6 - 7 (овец) или 7 - 8-е (коров) сутки.

Для млекопитающих характерно при дроблении уменьшение размеров бластомер и суммарное уменьшение объема всех бластомеров. Так, в ходе дробления объем эмбриона мыши уменьшается на 25%, эмбриона коровы - на 20%, а эмбриона овец - на 40%.

Ядра дробящихся бластомеров не уменьшаются в размерах, а объем протоплазмы (как было указано выше) уменьшается при каждом делении вдвое. Поэтому к шестому или седьмому дроблению в бластомерах эмбриона восстанавливается нормальное соотношение (1:6) объемов ядра и цитоплазмы.

В период дробления мембранный потенциал изменяется в зависимости от фаз митоза. В период дробления мембранный потенциал на различных стадиях развития эмбриона увеличивается от 15 (овулировавшая яйцеклетка) до 40 (бластоциста). У млекопитающих, в среднем, дробление начинается через 1 - 2 суток после овуляции и продолжается 12 - 13 дней. В течение первых суток происходит по одному делению в сутки, поэтому к четвертому дню зародыш обычно состоит из 8 - 12 бластомер. Уже на третьем цикле дробления бластомеры начинают вести себя по-разному.

Продвижение эмбриона к месту имплантации. После завершения процесса оплодотворения зигота, которая окружена прозрачной оболочкой, остается в истмусе от одного до четырех дней (табл. 10. 10.).

Таблица 10.10. Хронология предимплантационного развития эмбриона						
Вид животного	Дробление, час.		Поступление в матку*		Освобождение из ЗР, дни	Начало имплантации, дни
	Первое	Второе	Время, час	Стадия развития		
Крупный рогатый скот	20 - 24	32 - 36	72 - 84	Морула	9 - 11	22
Овцы	16 - 18	28 - 30	66 - 72	Ранняя морула	7 - 8	15
Свиньи	14 - 16	28	46 - 48	8-16-ти бластомерный эмбрион	6	13
Лошади	24	30 - 36	140 - 144	Бластоциста	8	37
* - стадия развития эмбриона рассматривается от овуляции						

Дробление эмбриона животных осуществляется в процессе медленного передвижения по фаллопиевой трубе. При этом у кролика, собаки и лошади дробящийся эмбрион покрывается в яйцеводе толстым слоем белка. Особенностью прохождения эмбриона через истмус является относительно быстрый переход через дистальный перешеек в матку, что связано с расслаблением мышечной ткани.

Путь от места оплодотворения (ампула) до места имплантации (матка) занимает у крупного рогатого скота 7 - 8 (морула), лошадей - 5-7 (морула - бластоциста), овец - 4-5 (ранняя морула), свиней - 2-3 (8-16-ти бластомерный эмбрион) дня. Следовательно, эмбрионы поступают из яйцепровода в рог матки, как правило, между 3 - 5-ью сутками.

Жидкость маточных труб необходима развивающему эмбриону в обеспечении питания. В ней происходит избирательное регулирование субстратов среды при изменении баланса гормонов в целях удовлетворения потребности эмбрионов и их способности к использованию субстратов. В количественном отношении секреция маточных труб изменяется в зависимости от баланса эстрогенных гормонов яичника и прогестерона. Осмотическое давление секретов маточных труб колеблется в пределах 300 - 310 мОсмоль.

В период прохождения эмбриона по яйцепроводу в матке идут подготовительные процессы, связанные с имплантацией, которые заключаются в удалении с помощью фагоцитоза продуктов, оставшихся после полового акта (сперма). Под действием прогестерона происходит пролиферация, повышение активности желез и секреция жидкости в просвет матки и, кроме того, происходит секреция гистотрофа (маточное молочко).

Неоплодотворенные яйцеклетки рассасываются после постепенного размягчения прозрачной оболочки и ее фрагментации. Сперматозоиды из полового тракта удаляются путем изгнания и поглощения нейтрофилами.

Оплодотворенные и неоплодотворенные яйцеклетки поступают в матку примерно в одно время, исключение составляют данные, полученные на лошадях. У кобыл неоплодотворенные яйцеклетки остаются в маточных трубах, где они подвергаются цитоплазматической дегенерации.

Для коров первая фаза сращения эмбриона начинается на 22-й день после осеменения, овец - на 15-й день, свиней - на 13-й день, лошадей (зародыш в просвете матки остается свободным больше месяца) - на 37-й день.

Резюме

При ознакомлении с данной темой Вы убедились, что изучение процессов, происходящих до начала собственного индивидуального развития животного, очень важно, так как от полноценности яйцеклетки и сперматозоида зависит в будущем биологическая полноценность индивида. Поэтому понимание процессов, происходящих при гаметогенезе необходимо будущему специалисту для регулирования таких важных биологических процессов, как гаметогенез, оплодотворение гамет и предимплантационное развитие эмбрионов.

Особенностью в биологии развития млекопитающих животных является то, что для них характерно внутреннее оплодотворение, при этом одну яйцеклетку всегда оплодотворяет только один сперматозоид. Оплодотворение ооцитов происходит в ампуле фаллопиевой трубы с образованием зиготы, который через 24 часа образует путем первого дробления эмбрион на стадии двух бластомер. После чего эмбрион начиная с этой стадии перемещается в сторону матки для имплантации. Особенностью предимплантационного развития эмбрионов животных является то, что, во-первых, эмбрион от стадии зиготы до стадии бластоцисты развивается в прочной с биологической точки зрения зоне пеллюцида, во-вторых, эмбрион в течение 3 - 7 дней развивается в гениталиях самки животных в свободном состоянии; в-третьих, эмбрион в процессе развития перемещается по репродуктивному тракту самки животных от места оплодотворения (ампула фаллопиевой трубы) до места имплантации (матка).

Ключевые слова и понятия:

Акросома
Акросомная реакция
Активация яйцеклетки
Атрезия фолликула
Блокирование мейоза
Блокирование развития
Гамета: яйцеклетка, сперматозоид
Гаметогенез
Зигота
Капацитация
Карногамия
Клетка

Клеточная теория
Мейоз
Митоз
Овуляция
Оогенез
Оплодотворение
Периоды гаметогенеза
Сперматогенез
Сперматозоид
Фолликулогенез
Эмбрион
Яйцеклетка

Контрольные вопросы:

1. Каковы основные положения клеточной теории?
2. Дайте определение термину «клетка».
3. Перечислите признаки, которые отличают клетки прокариот от клеток эукариот.
4. Почему прокариоты и эукариоты относят к одной системе организации живого?
5. Что понимают под термином «тотипотентность»?
6. Охарактеризуйте морфологию и молекулярный состав соматической клетки животных.
7. Какие функции для клеток животных являются основными?
8. Какую качественную особенность несет в себе живая клетка?
9. Чем определяется преемственность между поколениями у животных?
10. О чем свидетельствует двуполость у высших животных?
11. Сколько типов гамет различают у животных?
12. Какой механизм обуславливает способность к движению у сперматозоидов?
13. Чем обусловлено строение сперматозоида?
14. Что для сперматозоида является органом движения в гениталиях самки и в яйцеклетке после оплодотворения?
15. Что вносит сперматозоид в яйцеклетку при оплодотворении?
16. Какой биологической особенностью обладает яйцеклетка?
17. Какова взаимосвязь между ооцитами и фолликулами?
18. Какие клетки принимают участие в синтезе оболочек яйцеклеток?
19. Из каких периодов состоит сперматогенез, а из каких – оогенез?
20. В какие периоды мейоза происходит блокирование в развитии ооцитов?
21. В какой период оогенеза происходит вителлогенез?
22. Почему ядерно-цитоплазматическое соотношение в яйцеклетках составляет 1:550, и почему нужно такое соотношение?
23. Стадии фолликулогенеза.
24. Стадии оогенеза и сперматогенеза.
25. Чем отличается сперматогенез от оогенеза.
26. Овуляция.
27. Желтое тело.
28. Гормоны гипофиза.
29. Гормоны яичника.
30. Каким образом происходит связь между гипоталамусом, гипофизом и яичником при оогенезе и фолликулогенезе?

Рекомендуемая литература. Для изучения вопросов, касающихся прогенеза, рекомендую обратиться к следующим работам: Де Робертис Э., Новинский В., Саэс Ф. Биология клетки: Пер. с англ. – М.: Мир, 1973; Зенгбуш П. Молекулярная и клеточная биология в 3 т.: Пер. с нем. – М.: Мир, 1982; Каппучинелли П. Подвижность живых клеток: Пер. с англ. – М.: Мир, 1982; Бернет Ф. Клеточная иммунология: Пер. с англ. – М.: Мир,

1971; Гордон Дж. Регуляция функции генов в развитии животных: Пер. с англ. – М.: Мир, 1977; Свенсон К., Уэбстер П. Клетка. Пер. с англ. – М.: Мир, 1990.

Вопросы эмбриологии хорошо раскрыты в следующих учебниках: И.С. танек. Эмбриология человека. М., Веда, 1977; Карлсон Б.М. Основы эмбриологии по Пэттену в 2 т.: Пер. с англ. – М.: Мир, 1983.

Глава 11. Культивирование, оценка, селекция и отбор гамет и эмбрионов

Цель: Ознакомиться с методами оценки, селекции и отбора гамет и эмбрионов, изучить процедуры, связанные с культивированием и экстракорпоральным оплодотворением.

После изучения главы студент сможет:

- дать определение терминам: “оценка”, “селекция”, “отбор”, “режим”, “культивирование”, “экстракорпоральное оплодотворение”, “дифференциация” и “детерминация”;
- регулировать процессы созревания гамет с использованием гормональных и белковых факторов развития;
- определять оплодотворяющую способность гамет;
- выявлять и регулировать факторы, влияющие на оплодотворение;
- проводить исследования по оплодотворению гамет *in vitro*.
- определять стадию развития предимплантационных эмбрионов;
- выявлять факторы, блокирующие эмбриональное развитие;
- регулировать факторы, способствующие успешному развитию эмбрионов “в культуре”;
- применять методы культивирования гамет и эмбрионов в практических целях;
- регулировать процессы развития эмбрионов с использованием гормональных и белковых факторов развития;
- проводить исследования по биотехнологии в животноводстве с применением методов эмбриоселекции и эмбриокультуры.

* * *

После извлечения из репродуктивного тракта самок животных ооциты (фолликулы) и эмбрионы помещаются в питательную среду, которая необходима для обеспечения всех внешних условий, имеющихся при *in vivo*. Только в этом случае возможно сохранение всех жизненных функций у ооцитов, фолликул и эмбрионов животных. Кроме того, питательная среда обеспечивает всем необходимым для успешного созревания гамет, их оплодотворения и дальнейшего эмбрионального развития *in vitro*.

11.1. Оценка гамет и эмбрионов

Для проведения эмбриокультуральных исследований гаметы обязательно подвергаются оценке. Оценка гамет сводится к определению их

биологической полноценности. Под биологической полноценностью гамет понимают их способность осуществить оплодотворение с целью зарождения нового индивидуума. Оценку гамет производят в следующих случаях:

1. При культивировании и оплодотворении *in vivo* оценивают только качество спермы (сперматозоидов). Ооциты в этом случае не оцениваются. У самок - доноров оценивают ооциты косвенно по полученным эмбрионам.

2. При культивировании и оплодотворении *in vitro* оценивают качество сперматозоидов и ооцитов. При этом оценка осуществляется в два этапа: на первом этапе (при культивировании *in vitro*) оценивают качество сперматозоидов и ооцитов; на втором (при оплодотворении *in vitro*) после оценки качества гамет до оплодотворения *in vitro* – оценивают качество полученных зигот после оплодотворения *in vitro*.

При действии низких температур оценивают качество сперматозоидов. Ооциты в животноводстве обычно не подвергаются замораживанию, поэтому для криоконсервации они не используются (за исключением фундаментальных исследований).

Таблица 11.1. Макроскопические показатели спермы

Вид животного	Объем спермы, в среднем, мл	Цвет	Запах	Консистенция
Бык	4 – 5	Белый	Отсутствует (парное молоко)	Сливкообразная
Баран	1 – 1,5	Белый	Отсутствует (жиропот)	Сливкообразная
Хряк	250	Молочно-белая	Отсутствует	Водянистая
Жеребец	60-80	Молочно-белая	Отсутствует	Водянистая

Из вышеизложенного следует, что при эмбриокультуральных исследованиях оценке подвергаются сперматозоиды. Исключением является процедура, связанная с культивированием и оплодотворением ооцитов *in vitro*. В этом случае для оценки ооцитов вначале (чаще всего) оценивают фолликулы. Под биологической полноценностью фолликул подразумевают их способность, во-первых, обеспечить ядерное, цитоплазматическое и мембранное созревание ооцитов, во-вторых, способность овулировать и формировать желтое тело. Поэтому вопросы, касающиеся оценки ооцитов в этом разделе не рассматриваются.

Таблица 11.2. Шкала для оценки качества спермы при микроскопическом исследовании

№	Показатель	Классность	Характеристика
1	Густота спермы	Густая – Г	Под микроскопом всё поле зрения заполнено сперматозоидами; между ними отсутствуют промежутки
		Средняя – С	Под микроскопом заметно движение отдельных сперматозоидов в связи с наличием небольших промежутков
		Редкая – Р	Наличие в поле зрения больших промежутков, поэтому размещение сперматозоидов свободное
		Олигоспермия – О	В поле зрения обнаруживаются лишь единичные сперматозоиды
		Аспермия - А	В поле зрения сперматозоиды отсутствуют
2	Подвижность сперматозоидов	Прямолинейно-поступательное – III:	
		10 баллов	Все сперматозоиды обладают этим движением
		9 баллов	90% сперматозоидов обладают этим движением
		8 баллов	80% сперматозоидов обладают этим движением
		Манежное – М	Сперматозоиды движутся по кругу
		Колебательное – К	Движение сперматозоидов напоминает «качающиеся качели»
		Неподвижное – Н	У сперматозоидов движение отсутствует

Сперму получают от производителей методом искусственной вагины. Детальный анализ физико-химических свойств спермы и его клеточного состава выходит за рамки этой главы. Ниже приводится лишь краткое обобщение некоторых нормальных характеристик спермы. Более подробно студент может изучить этот материал из других источников (см. указатель рекомендуемой литературы).

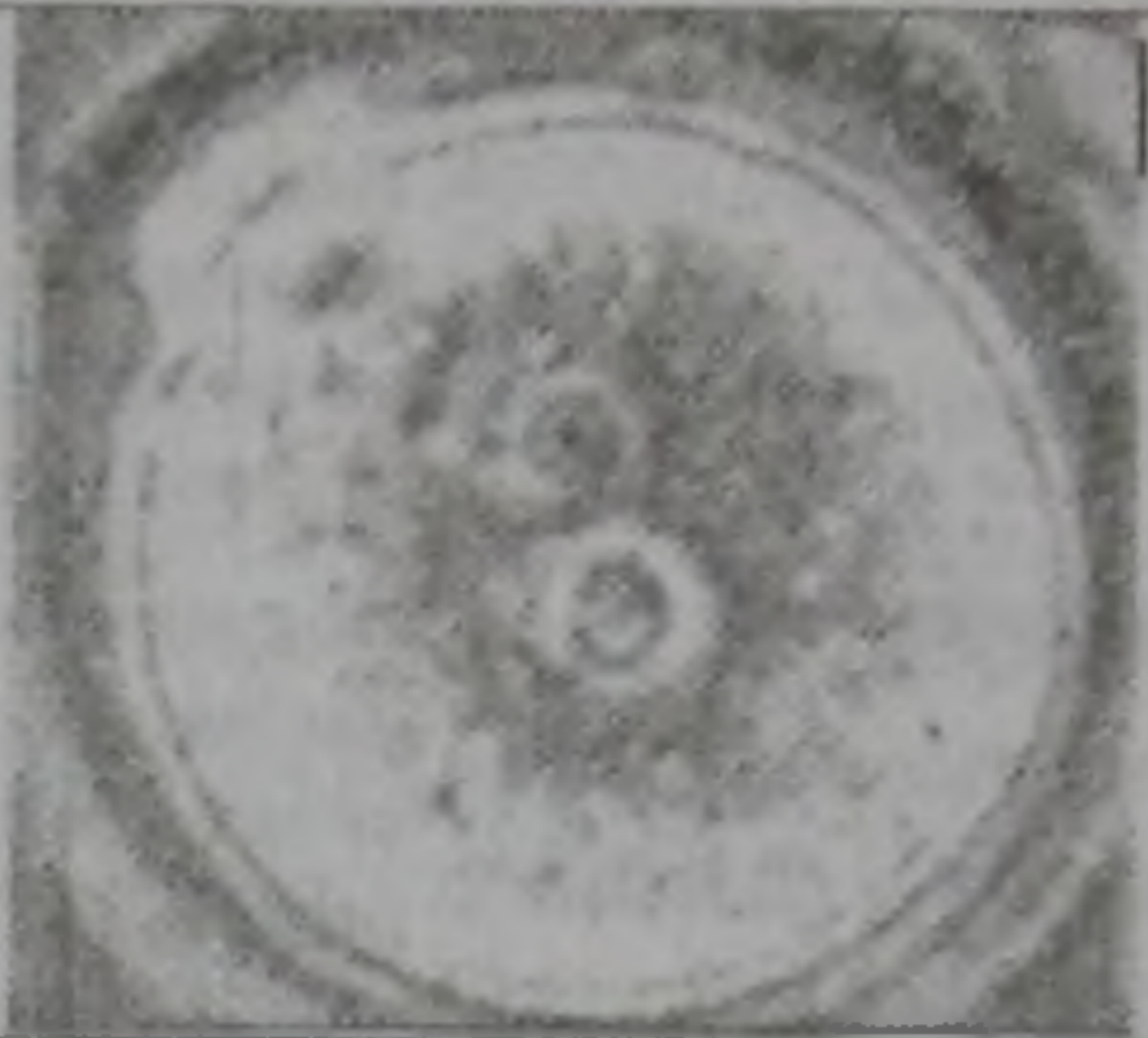
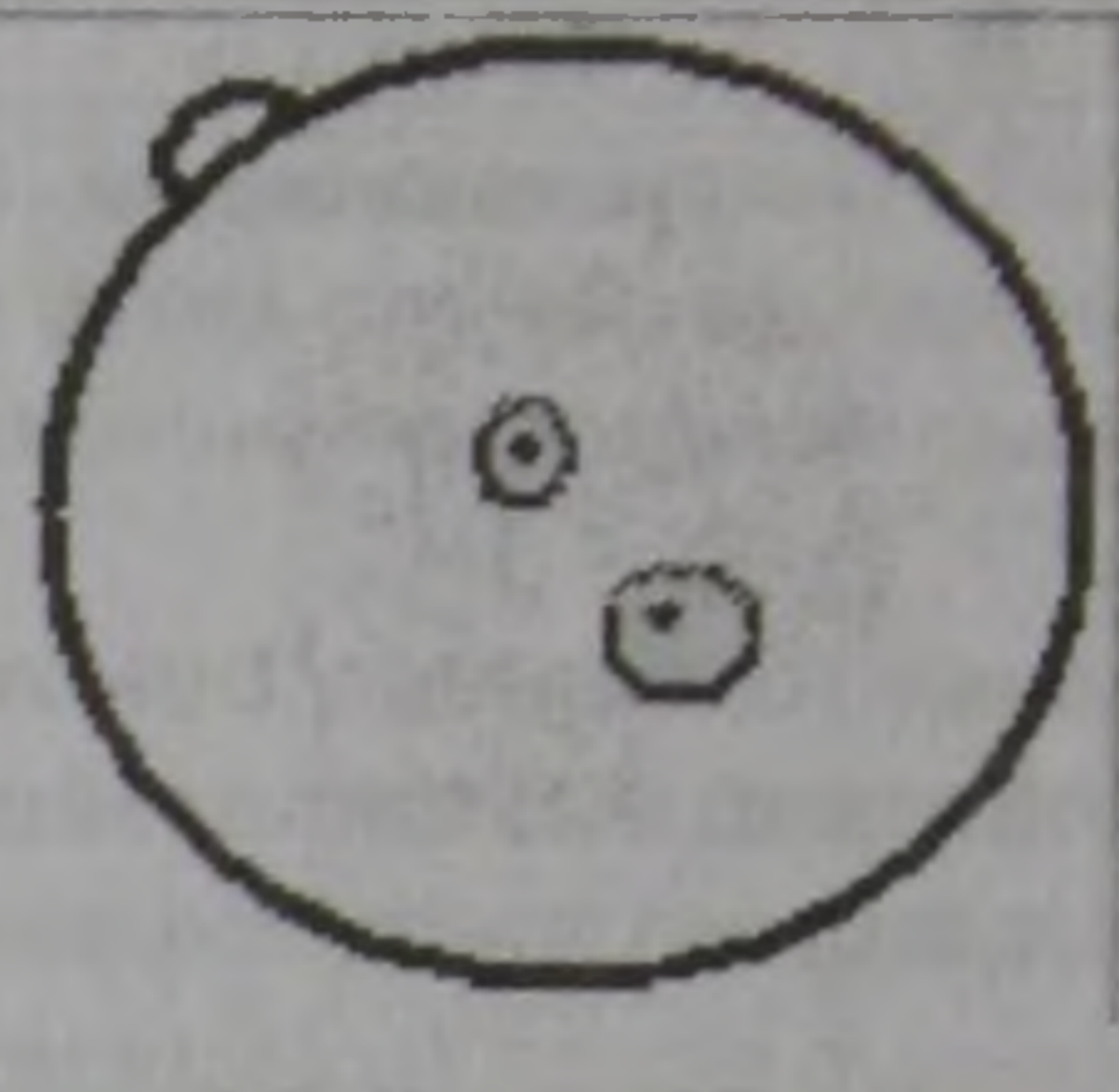
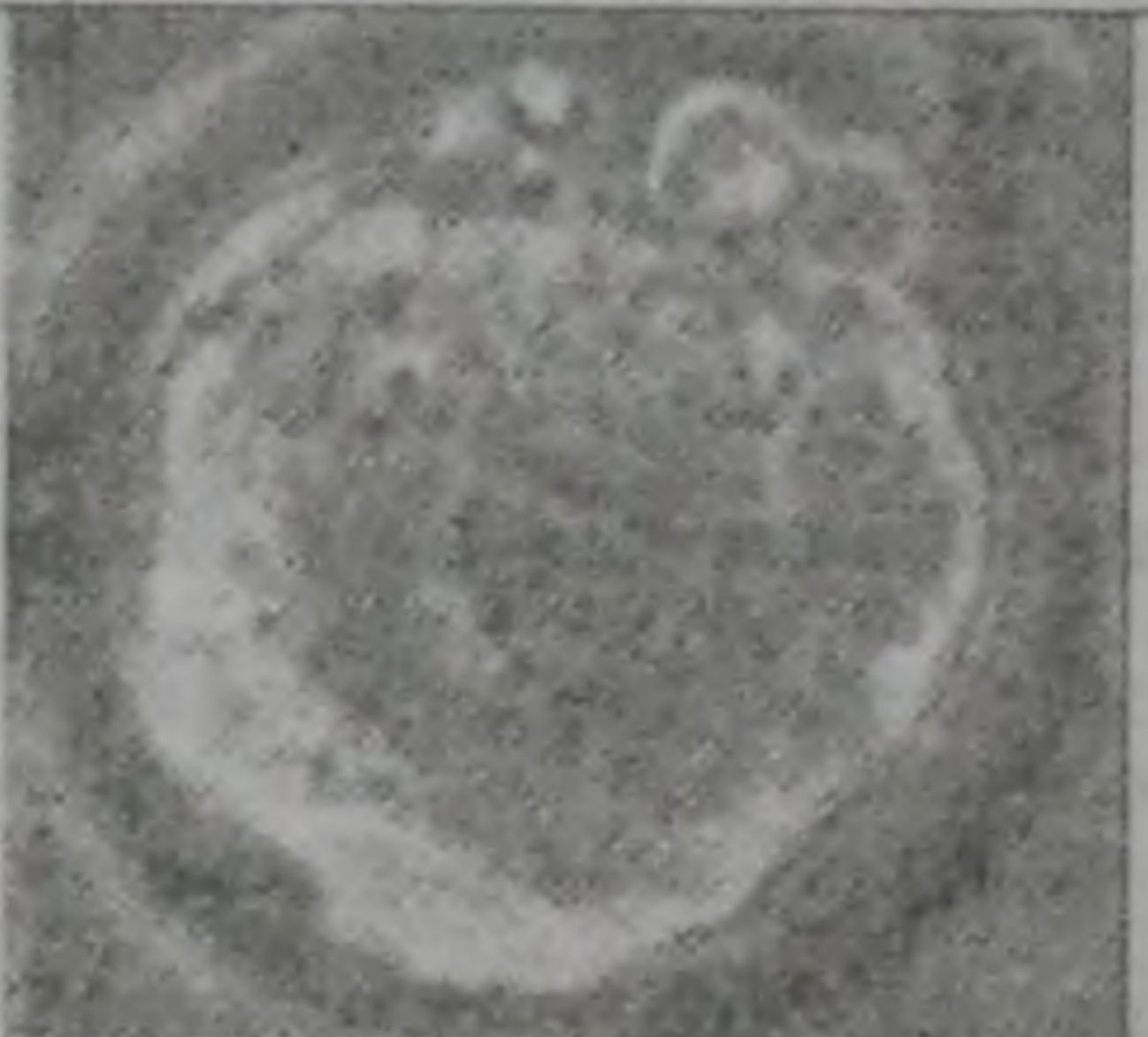
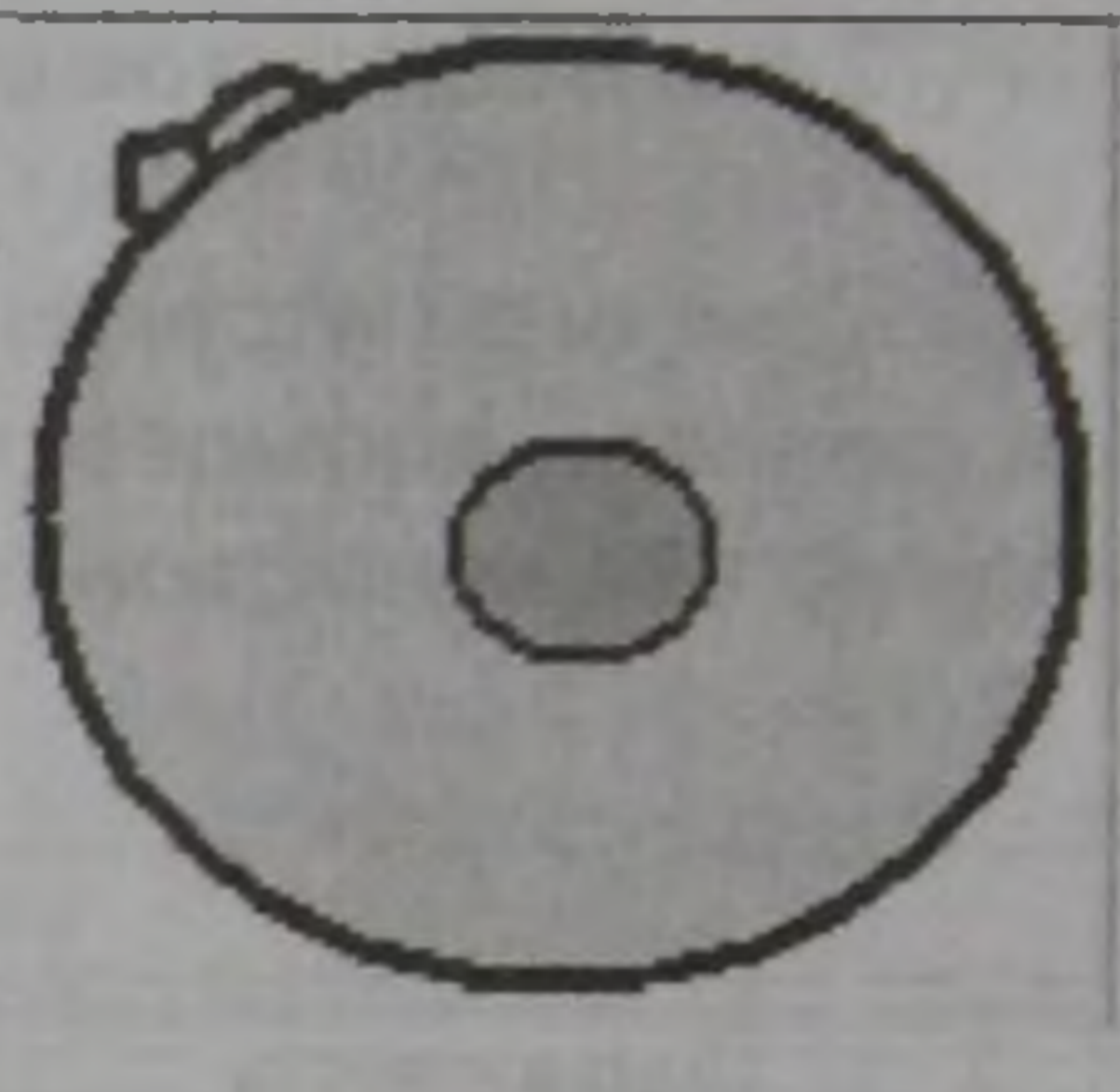
Стадия развития	Снимок на фотографии	Рисунок (схематическое изображение)
1. Зигота на стадии двух пронуклеусов		
2. Зрелая зигота		

Рисунок 11.1. Зигота на стадиях двух пронуклеусов (1) и зрелости (2).

Свежеполученную сперму исследуют вначале макроскопическим, а затем микроскопическим методом. При макроскопическом исследовании (визуальная оценка) основными показателями являются объем эякулята, цвет, запах и консистенция спермы. Благодаря этому исследованию дается общее заключение о пригодности спермы (табл. 11.1.).

При микроскопическом исследовании пользуются микроскопом, при этом определяют густоту спермы (количество сперматозоидов, находящихся в поле зрения), подвижность сперматозоидов, наличие мертвых и патологических сперматозоидов, интенсивность дыхания сперматозоидов и другие показатели. Основными же показателями являются густота и подвижность. Поэтому в таблице 11.2. указываются только показатели густоты и подвижности.

После вымывания из гениталий суперовулированных самок-доноров, эмбриокультуральных и эмбриоинженерных исследований предимплантационные эмбрионы обязательно подвергают оценке с целью определения их биологической полноценности. Под биологической полноценностью эмбрионов понимают их нормальное развитие, которое обязательно должно закончиться рождением нового организма.

Оценку эмбрионов производят в следующих случаях:

1. При культивировании *in vivo* и *in vitro*.
2. При действии низких температур.

3. При различных клеточных технологиях, связанных с получением клонированных, химерных и трансгенных животных.

4. При трансплантации эмбрионов.

Основным и главным показателем биологической полноценности эмбрионов является временная последовательность морфологических событий при их развитии. Поэтому биологическая полноценность эмбрионов выражается соответствием, во-первых, морфологических особенностей по определенным стадиям развития эмбриона и, во-вторых, стадии развития возрасту эмбриона. При оценке морфологических особенностей учитывают следующие основные признаки: 1) форма эмбриона; 2) целостность зоны пеллюцида и прозрачность периветеллинового пространства; 3) формы, размеры и равномерность развития бластомеров, и их распределение внутри зоны пеллюцида.

При оценке возраста эмбриона учитывают временную последовательность событий при их развитии, которая определяется соответствием либо уровня дробления возрасту от оплодотворения до их извлечения (при вымывании эмбрионов из гениталий самок-доноров), либо с биологическим стандартом развития (при эмбриокультуральных и эмбриоинженерных исследованиях), которая зависит от видовой принадлежности животных (табл. 11.3; рис. 11.1. - 11.3; рисунки представлены в табличном варианте; рис. 11.4).

Для оценки качества эмбрионов, предназначенных для трансплантации, используют, в основном, следующие методы:

1. Визуально-морфологический метод оценки, основанный на применении микроскопа серии МБС. Под микроскопом в проходящем свете при 160-кратном увеличении определяют форму эмбриона, его морфологическое строение и жизнеспособность. Жизнеспособность определяется по соответствию уровня дробления возрасту от оплодотворения до их получения (при вымывании или оплодотворении и культивировании *in vitro*).

Таблица 11.3. Биологический стандарт развития для предимплантационных эмбрионов млекопитающих

Возраст эмбриона		Временная характеристика*, час	Диаметр, мм	Характеристика	Признак
Стадия	Возраст эмбриона				
Зигота	Двух пронуклеусов	6-12	0,15 – 0,18	Период G ₁ . Выделяется второе полярное тельце. Формируется вначале мужской, а затем женский пронуклеусы. После чего происходит миграция пронуклеусов к центру. Продолжительность стадии 10 - 11 часов.	Визуально мужской пронуклеус крупнее женского.
	Зрелая зигота	12 – 24		Период S и G ₂ . Происходит растворение пронуклеарных мембран и карิโอгамия. Продолжительность стадии 10 - 12 часов. Первый клеточный цикл завершается цитокinesisом, который приводит к образованию двух бластомер.	Хорошо выражена зона теллюида.
Ранние стадии дробления	Двух бластомер	24 – 44	0,14 – 0,17	Первая (G ₁) и вторая (S) транскрипция эмбриональных генов. Длительность второго клеточного цикла составляет, в среднем, 20 часов.	Бластомеры округлой или овальной формы, контакт между бластомерами слабый.
	Четырех – шести и восьми бластомер	44 – 96		Третий и последующие циклы приближаются по своей длительности к 12-часовому циклу соматической клетки.	Бластомеры округлой или овальной формы, контакт между бластомерами слабый.
				При четвертом клеточном цикле происходит поляризация цитоплазмы и компактизация (S).	
Морула	Ранняя морула (16-32 бластомерный)	100 – 120	0,14 – 0,17	На пятом клеточном цикле происходит рекомпактизация интактных эмбрионов, что сопровождается образованием наружных и внутренних клеток.	Начало компактизации, бластомеры сферической формы, одинаковой величины, первичное единное пространство свободно от отдельных бластомер-

					бластомеров и цитоплазмы, виды еще отдельные бластомеры
				120 - 144	Шестой клеточный цикл является началом кавитации.
				144 - 150	У нормальных эмбрионов может иметь место формирование более чем одной полости, но по мере развития они сливаются в одну. Для этой стадии характерно наличие двух типов клеток: ТЭ и ВКМ.
				148 - 168	Прогрессивное дифференцирование. Эмбриобласт темный, отчетливо ограничен. Клетки трофобласта сильно сглажены. Перивителлиновое пространство вследствие расширения полости бластоцисты полностью вытеснено. Зона пеллюцида отстает, крепость стенки ослабляется. Зона пеллюцида утоньшается.
Бла-сто-циста				168 - 192 - 216	Вначале зона пеллюцида открыта и поэтому некоторые части эмбрионов вне зоны пеллюцида. Эмбрион приобретает шарообразную форму. Эмбриобласт и трофобласт отчетливо различаются. Полость бластоцисты от вялой до упругой. В конце - зона пеллюцида отсутствует.

♦ - рассматривается от формирования оболочки оплодотворения.

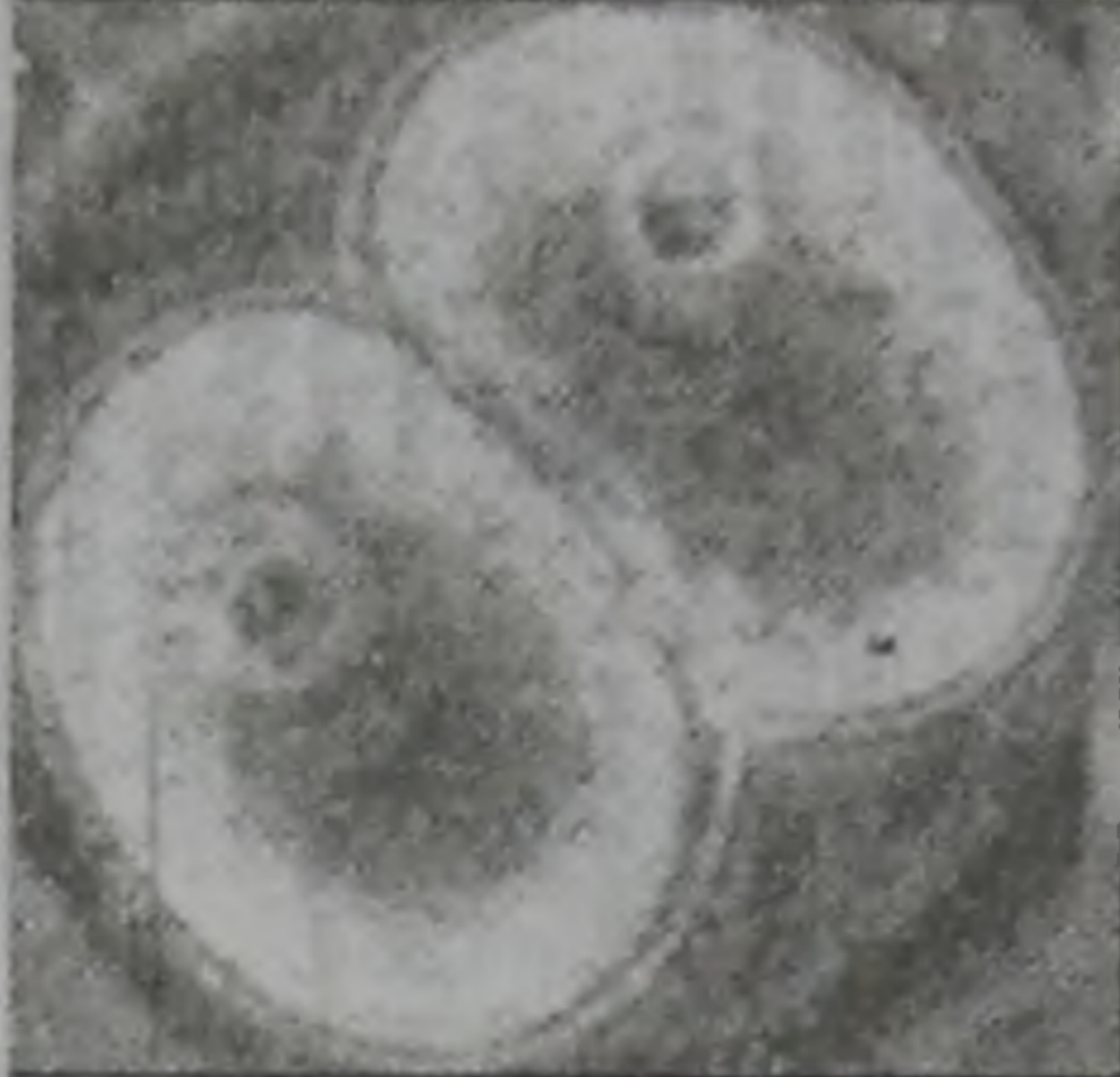

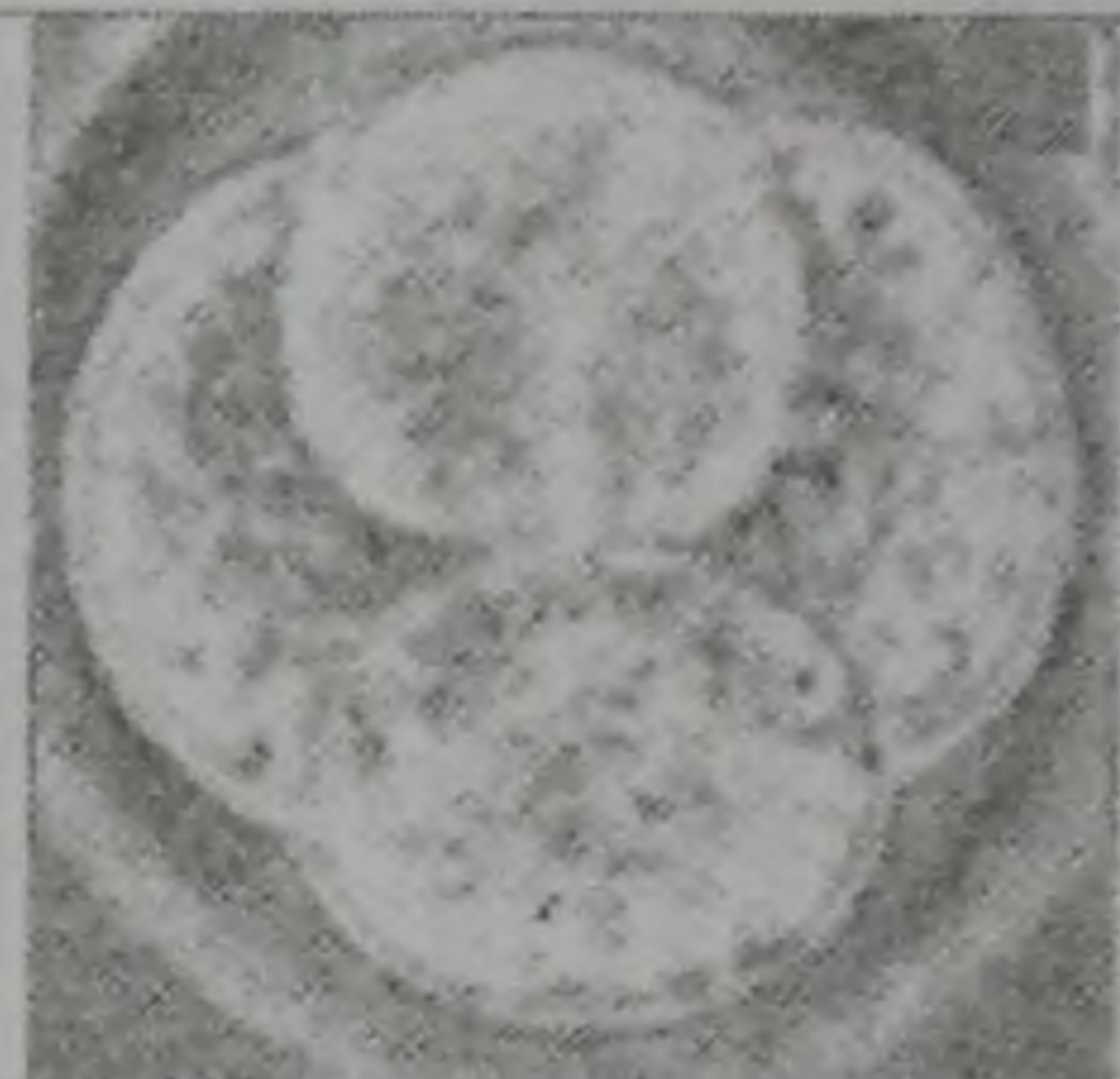
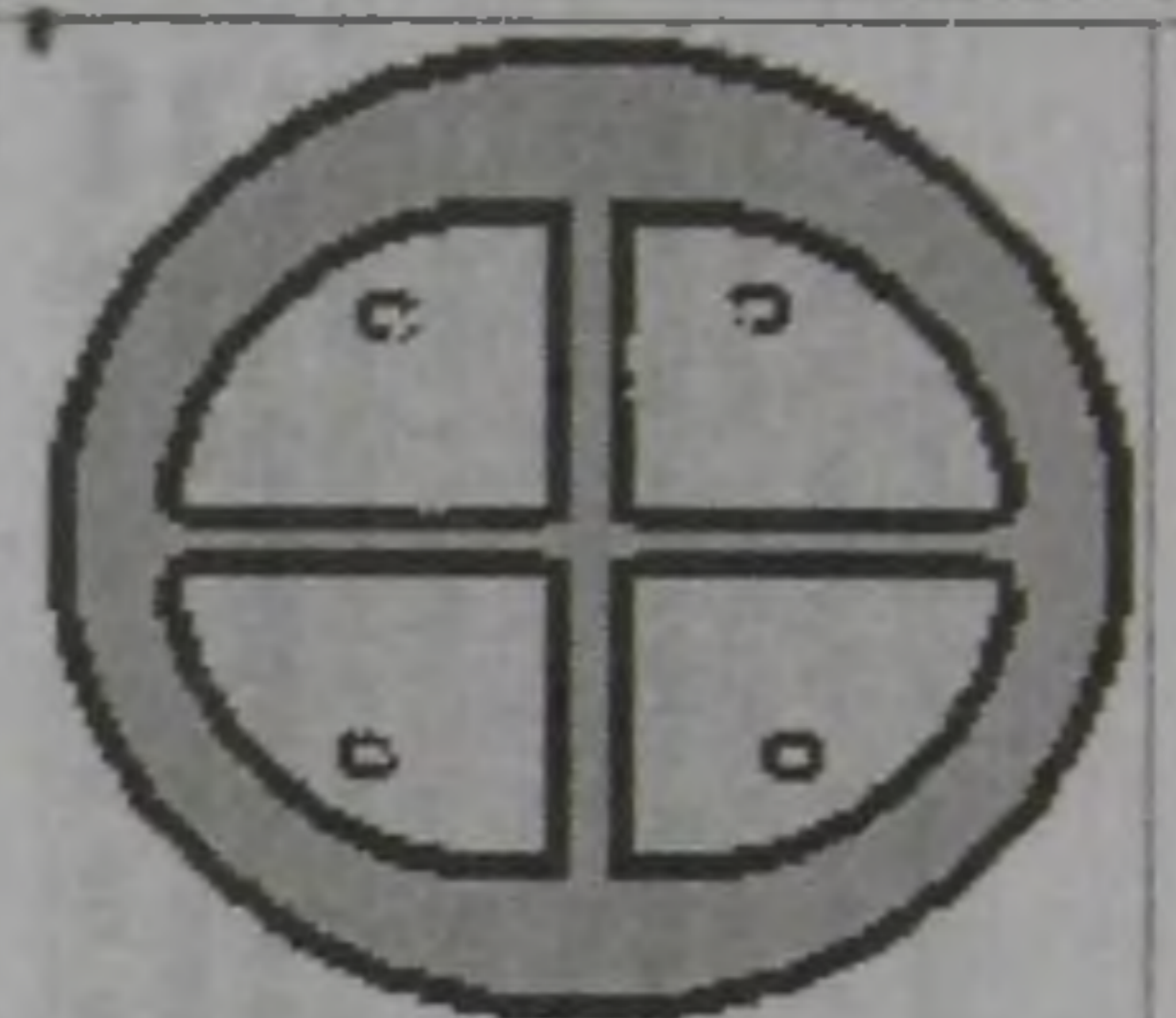
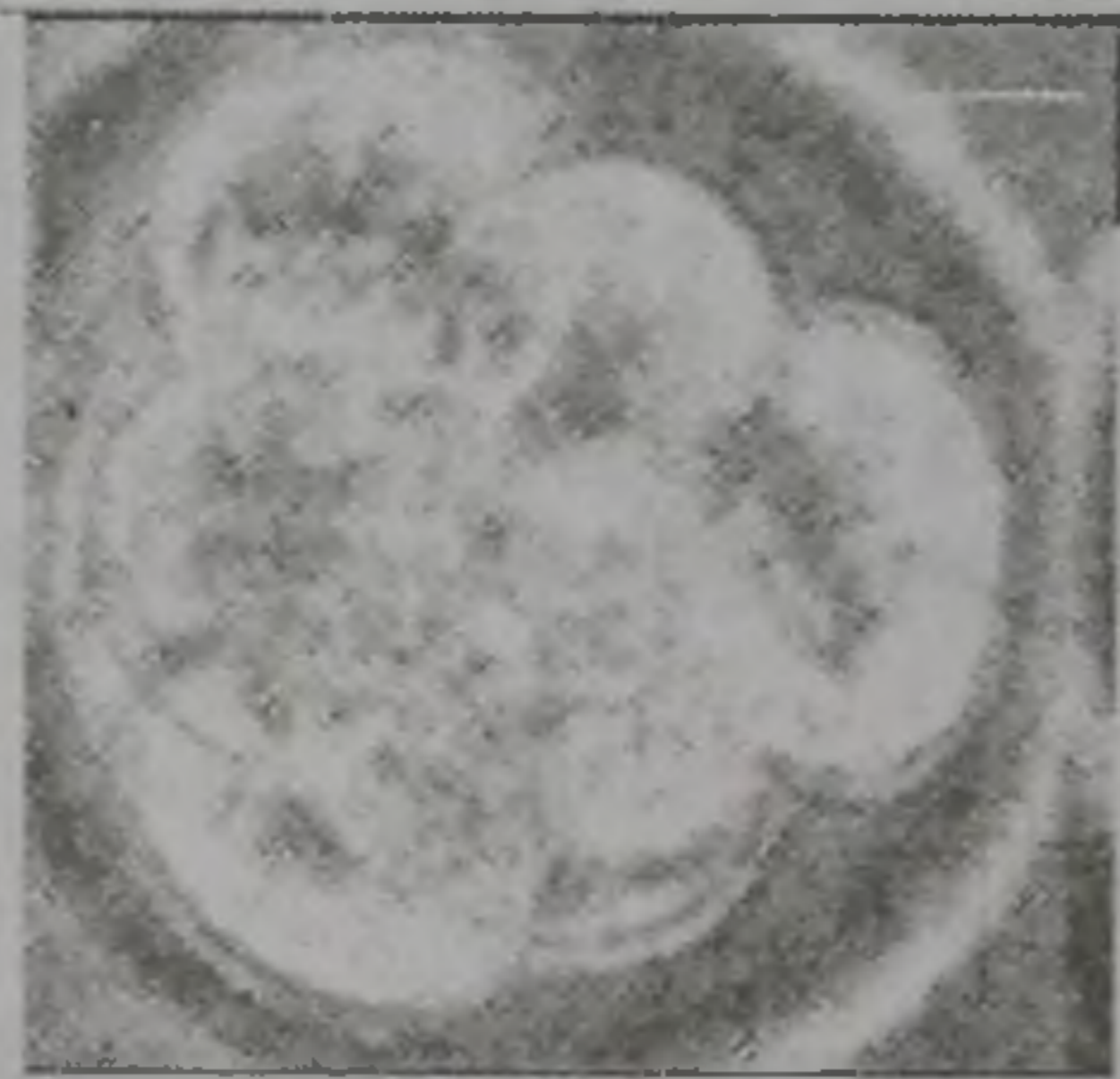
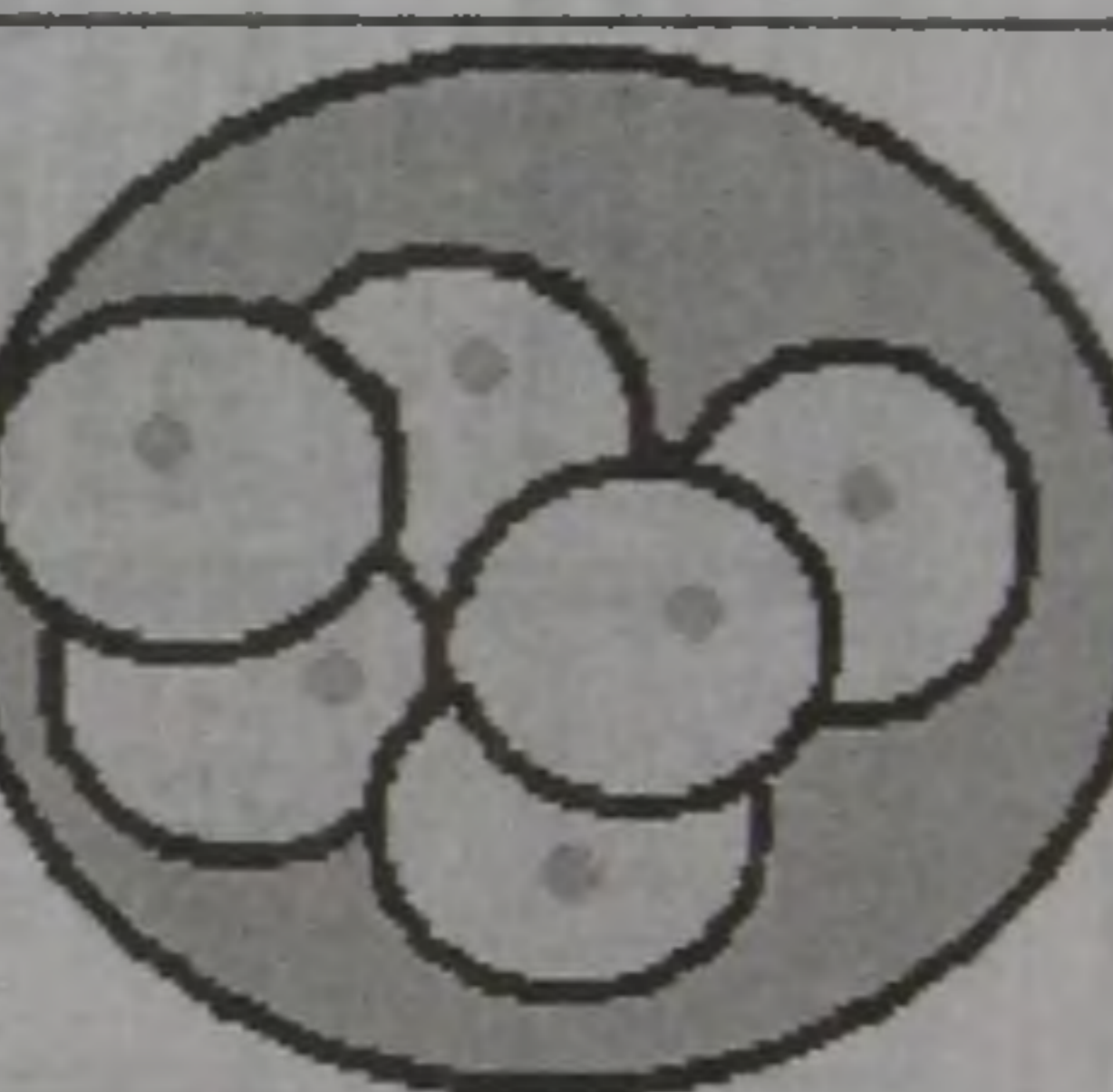
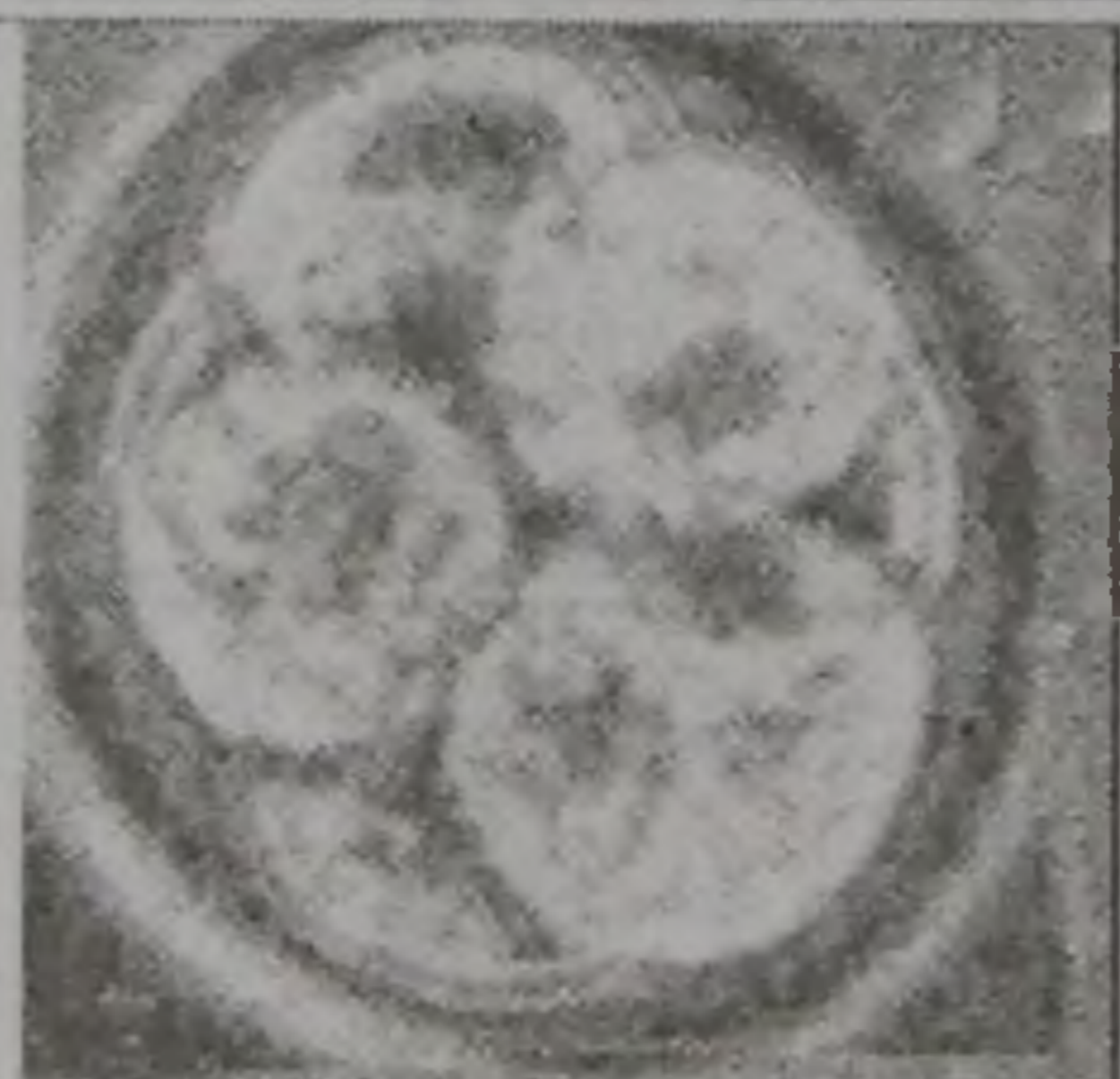
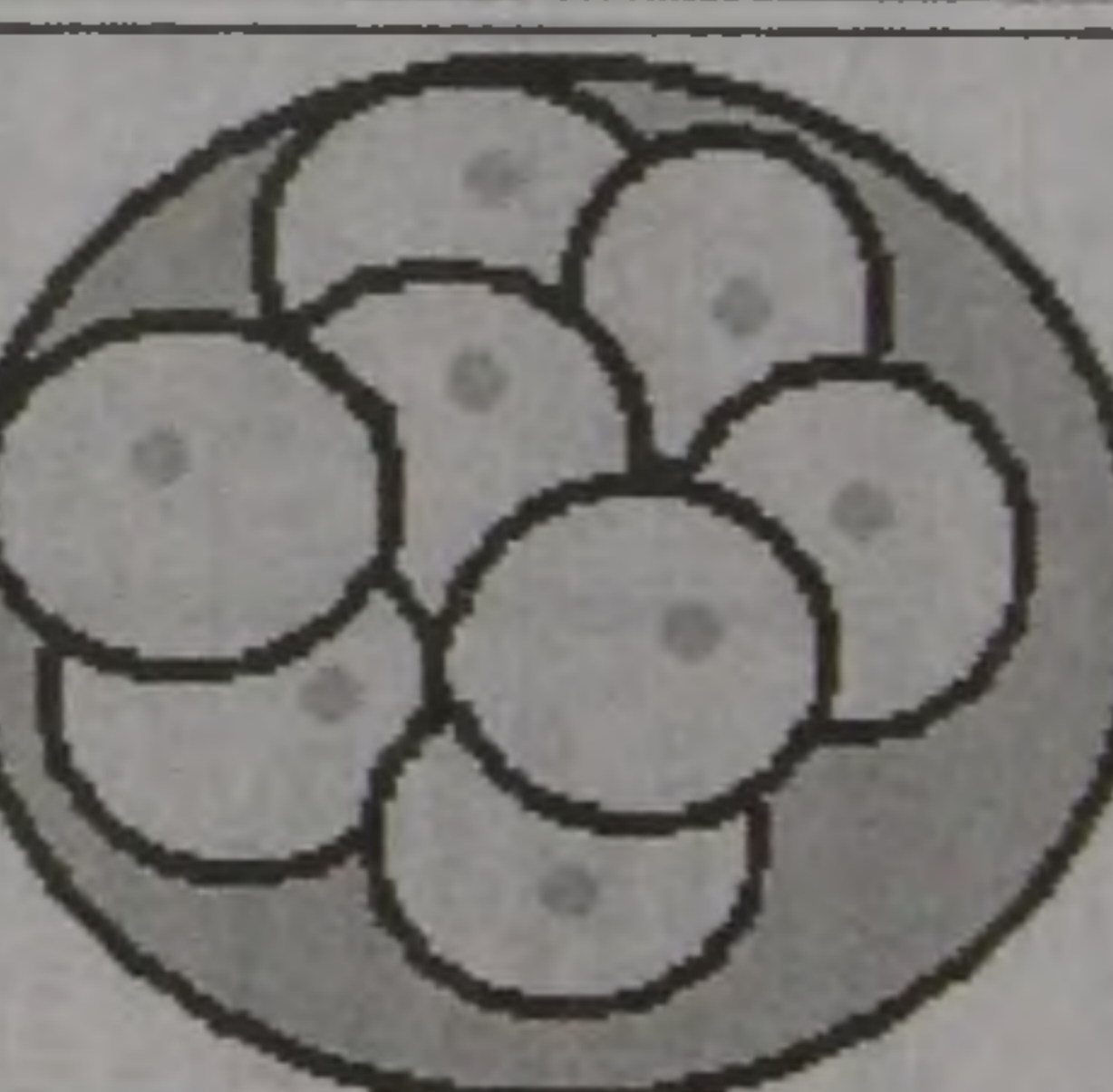
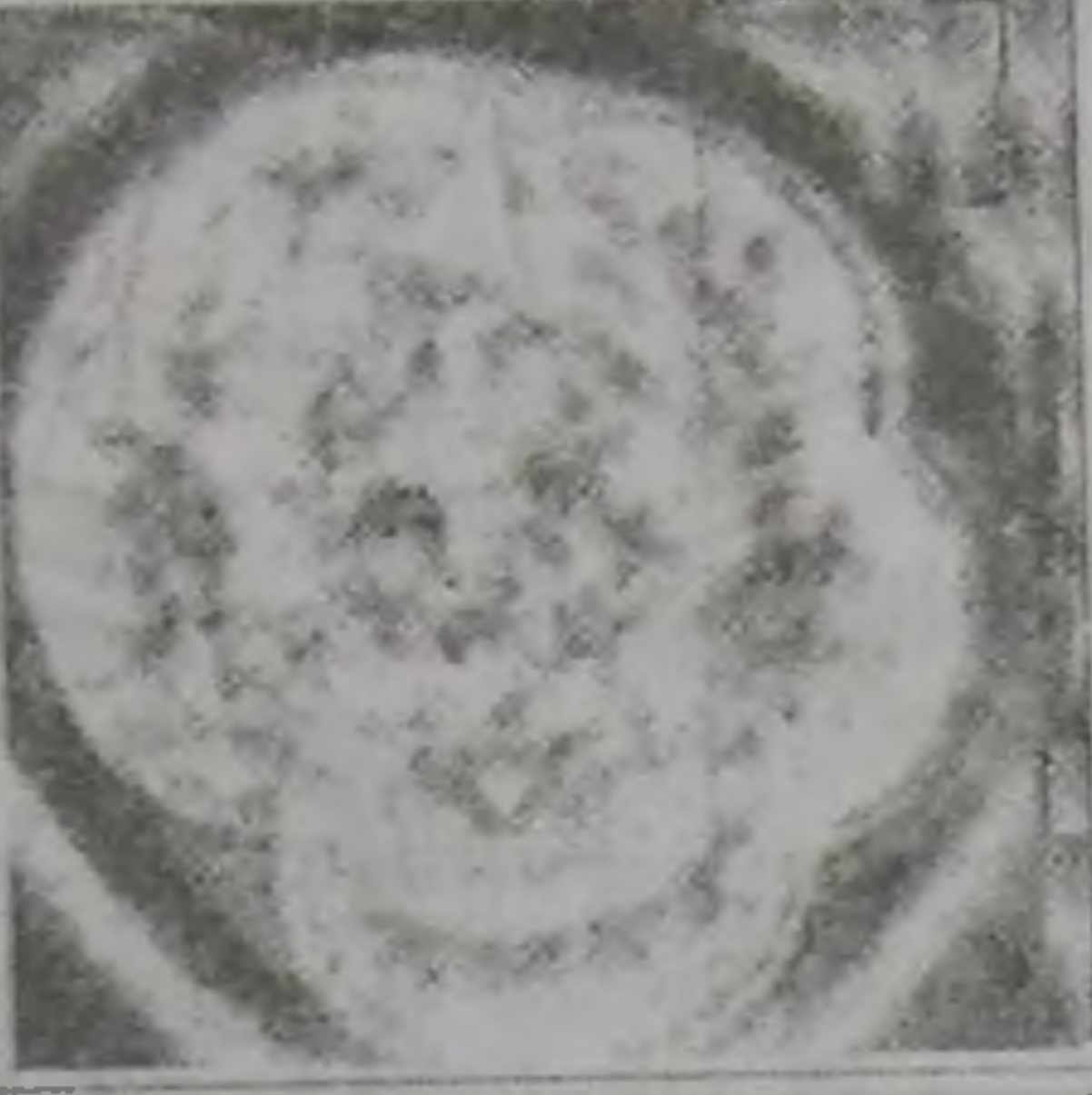
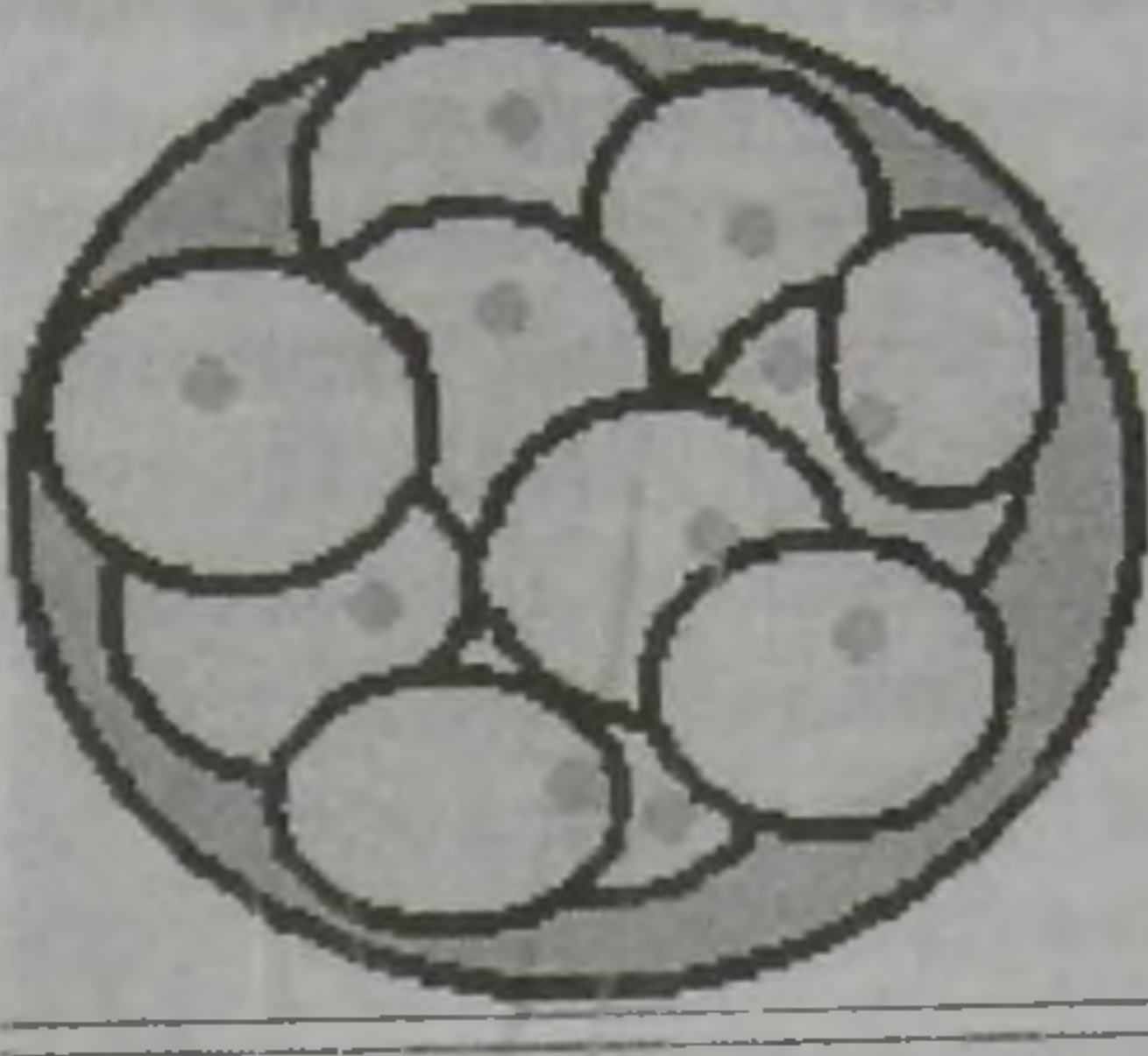
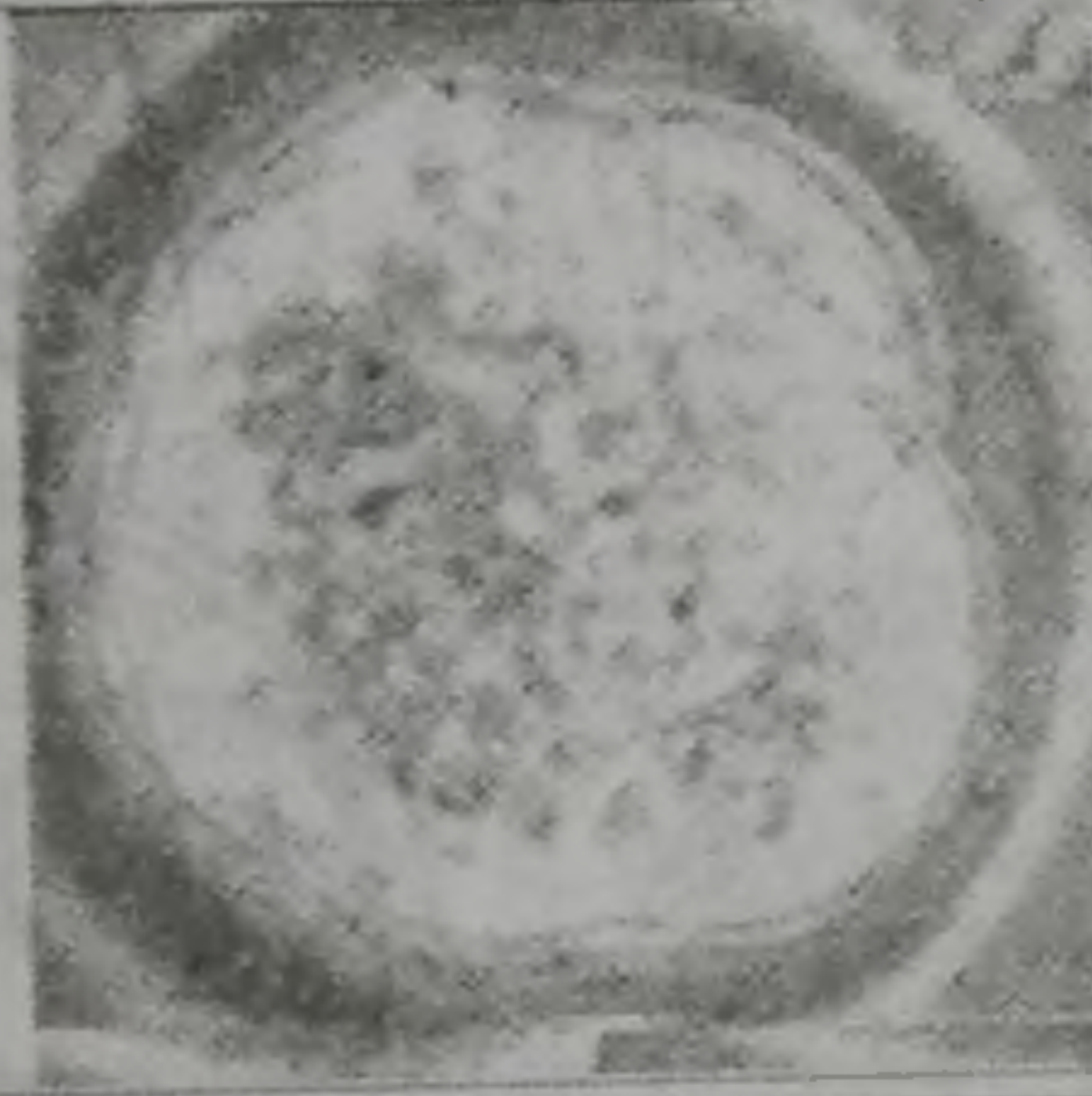
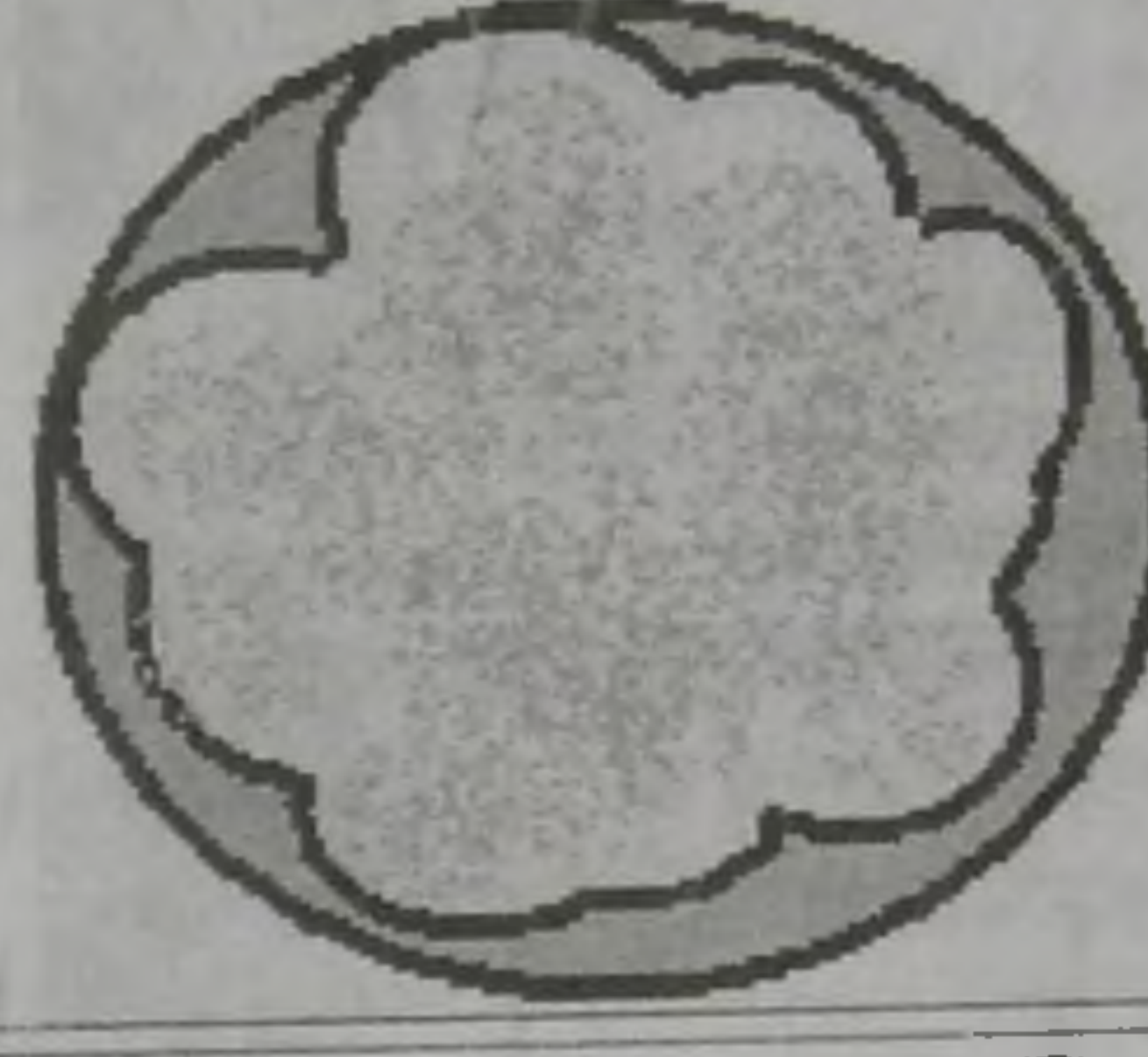
Стадия развития	Снимок на фотографии	Рисунок (схематическое изображение)
3. Двух бластомерный эмбрион		
4. Четырех бластомерный эмбрион		
5. Шести бластомерный эмбрион		
6. Восьми бластомерный эмбрион		

Рисунок 11.2. Предимплантационные эмбрионы на ранних стадиях дробления. Эмбрионы на стадиях двух (3), четырех (4), шести (5) и восьми (6) бластомер.

Стадия развития	Снимок на фотографии	Рисунок (схематическое изображение)
7. Морула ранняя		
8. Морула поздняя		
Рисунок 11.3. Предимплантационные эмбрионы на стадии ранней (7) и поздней (8) морулы.		

Наиболее приемлем данный метод оценки для предимплантационных эмбрионов, находящихся на ранних стадиях дробления, а именно от зиготы до стадии морулы и экспандированной бластоцисты.

По морфологическим признакам и эмбриональной стадии развития эмбрионы можно классифицировать на пригодные и непригодные к трансплантации.

При морфологической оценке методика работ сводится к выполнению следующих основных процедур (более подробно методика излагается в практикуме):

1) вымывание эмбрионов из гениталий самок - доноров (вместе с током жидкости эмбрионы поступают в эмбриоприемник);

2) через 10 - 20 минут после отстаивания в термостате при 37°C осторожно удаляют верхний слой питательной среды и под микроскопом начинают исследовать дно эмбриоприемника, где сосредоточены эмбрионы, при этом обнаруживают оплодотворенные (биологически полноценные эмбрионы, биологически неполноценные эмбрионы) и неоплодотворенные ооциты;

3) для эмбрионов определяют стадию развития, и соответствие данной стадии времени извлечения от момента предполагаемого оплодотворения (на этом этапе обнаруживают жизнеспособные и нежизнеспособные эмбрионы);

4) изучают морфологические признаки эмбриона для полученных стадий, при этом особое внимание уделяют форме эмбриона, целостности зоны

пеллюцида, размерам и равномерности развития бластомеров, распределению бластомер внутри зоны пеллюцида (на этом этапе обнаруживают биологически полноценные и неполноценные эмбрионы);



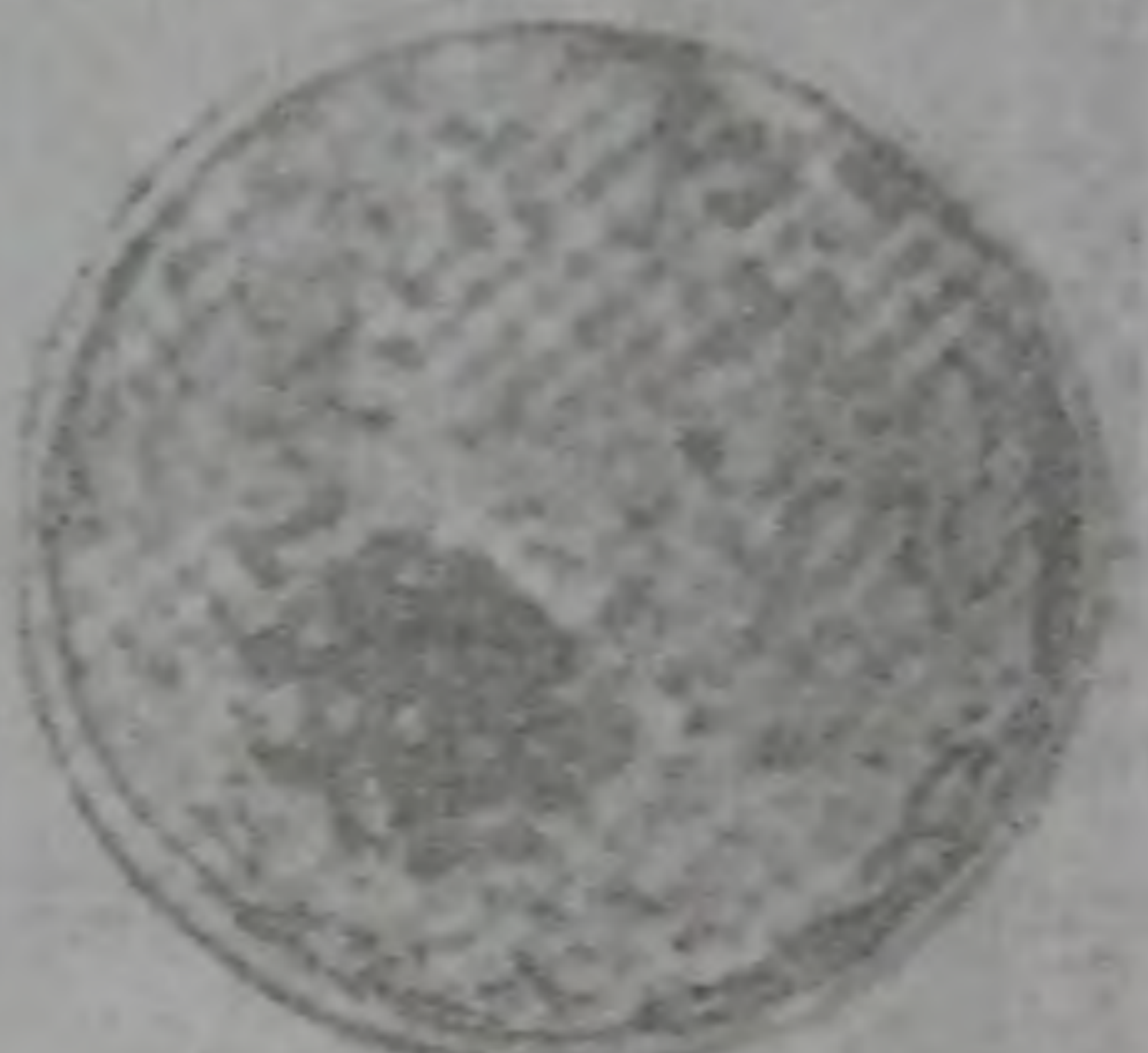
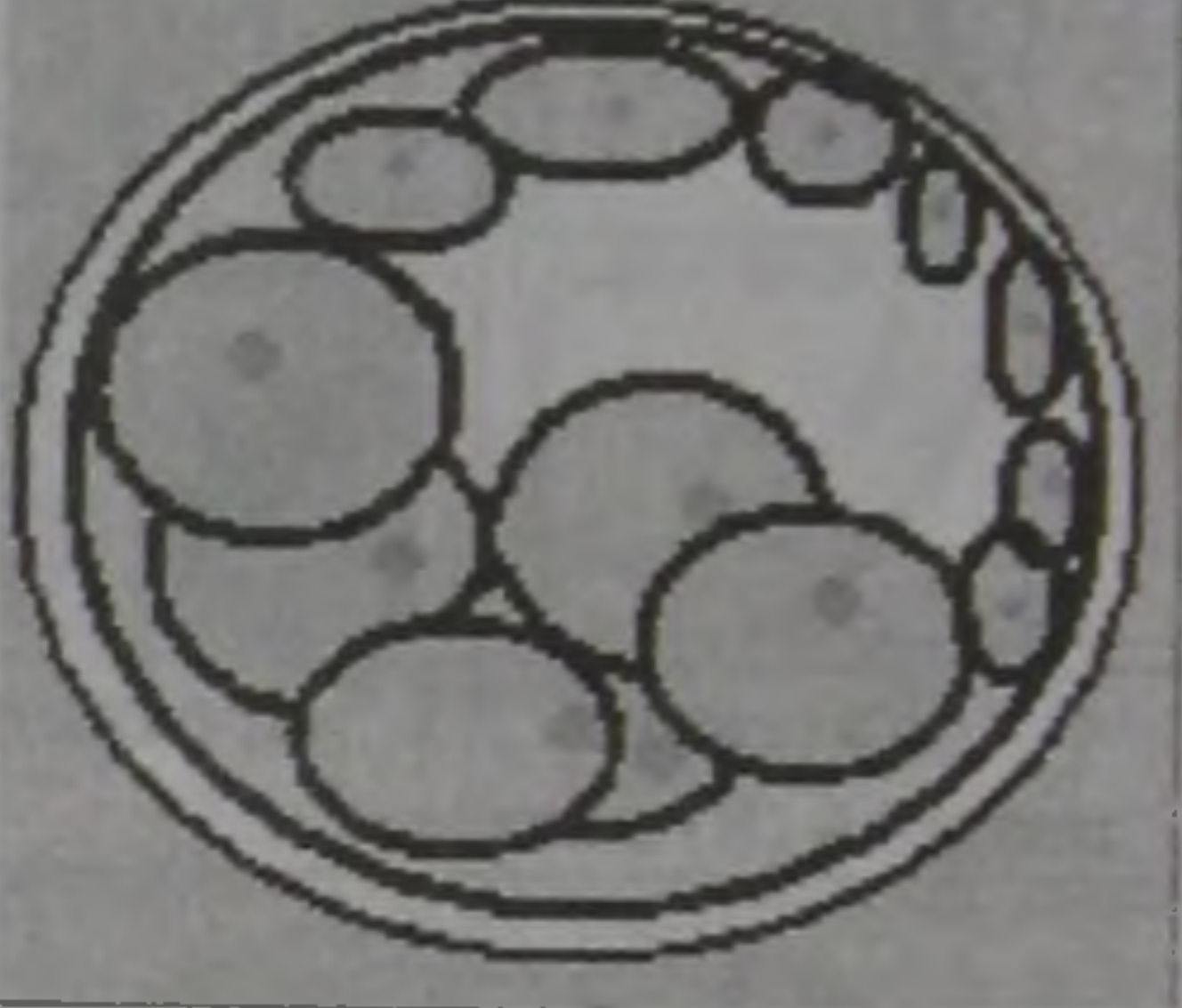
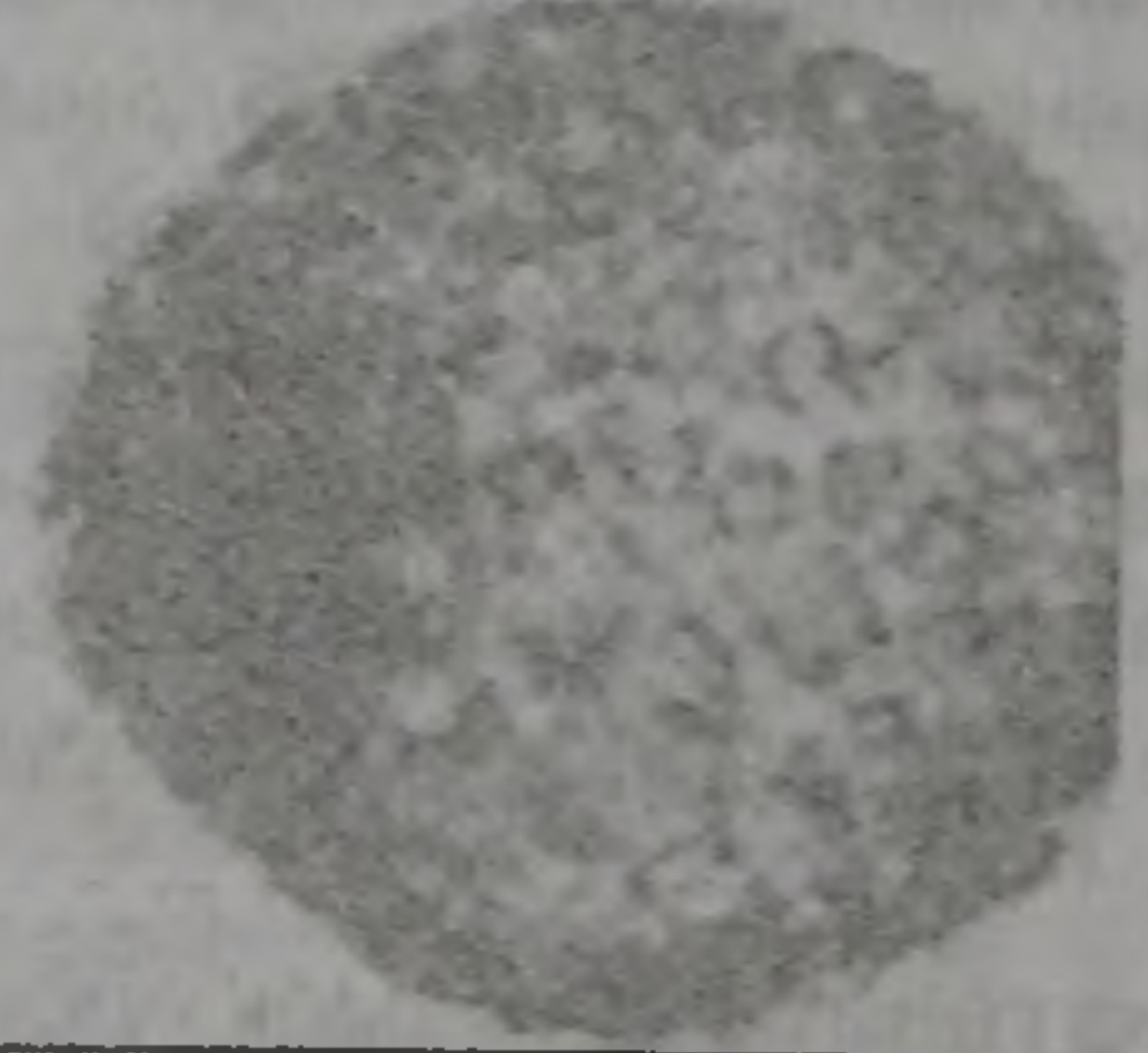
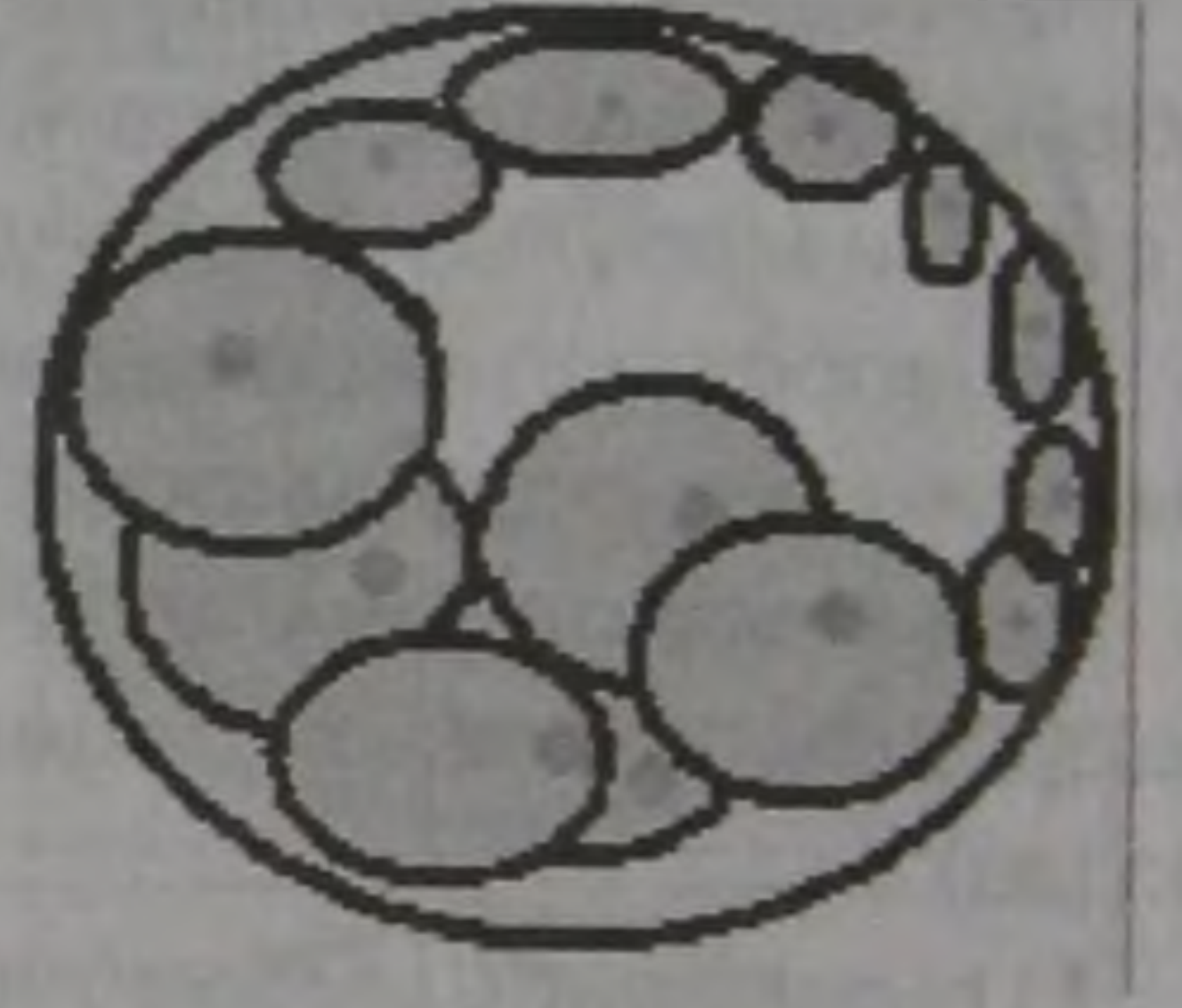
Стадия развития	Снимок на фотографии	Рисунок (схематическое изображение)
9. Бластоциста ранняя		
10. Бластоциста экспандированная		
11. Бластоциста вылупившаяся		

Рисунок 11.4. Предимплантационные эмбрионы на стадии ранней (1), экспандированной (2) и вылупившейся (3) бластоцисты.

5) часовые стекла с эмбрионами осторожно покачивают, чтобы иметь возможность осмотреть зародыш со всех сторон (на этом этапе изучают стадии развития эмбрионов).

2. Метод культивирования, основанный на обеспечении инкубационных условий для развития эмбрионов в условиях *in vitro*. Благодаря данной методике уже через 12 - 24 часа можно обнаружить блокирование в развитии у нежизнеспособных эмбрионов. Следует при этом отметить, что в условиях *in vitro*, в связи с "экстремальными" для эмбрионов условиями, эмбрионы

отстают по темпу дробления на 20 - 35% от "биологически запрограммированных часов" развития. При этом у биологически полноценных эмбрионов вырабатывается адаптационная реакция, способствующая сохранению жизнеспособных качеств, а у биологически неполноценных эмбрионов таких возможностей нет. Поэтому биологически полноценными считаются эмбрионы, которые в течение 12 - 36 часов проявляют признаки деления.

Эмбрионы, которые не достигли определенных стадий развития в указанное время, как правило, подвергаются дегенерации. Способность эмбрионов развиваться путем дробления служит основным критерием их развития. Поэтому только способные к развитию эмбрионы могут благополучно после пересадки развиваться в матке до стадии бластоцисты и имплантироваться в ней после гастрюляции.

3. Оценка эмбрионов по адсорбционным свойствам оболочек и цитоплазмы бластомеров к различным красителям. Метод основан на использовании флуоресцентных красителей (флуоресцеиндиацетат, акридиноранж, синька Эванса, нейтральный красный и др.). В живых эмбрионах зона пеллюцида на красители не реагирует (но если окрашивается зона пеллюцида, то ее затем обесцвечивают в растворе Рингера), в мертвых же эмбрионах краска прочно фиксируется не только на зоне пеллюцида, но и на бластомерах. Метод наиболее пригоден для оценки жизнеспособности эмбрионов после их культивирования и замораживания. Следует отметить, что флуоресцентная окраска лишь дополняет и улучшает основной морфологический метод оценки эмбрионов.

Принцип методики сводится к следующему: эмбрионы помещают в микрокаплю с красителем и при комнатной температуре инкубируют в течение 1 - 10 мин, что зависит от используемого красителя. По истечении этого времени в отраженном свете люминесцентного микроскопа выявляют нежизнеспособные эмбрионы. У таких эмбрионов зона пеллюцида проницаема для красителей и, поэтому для них характерна положительная на краситель реакция. А биологически полноценные эмбрионы характеризуются стойкостью к красителям, поэтому они не окрашиваются и не дают люминесцентного свечения.

Из всего вышеизложенного следует, что наиболее важными морфологическими признаками при оценке жизнеспособности эмбрионов служат объем, окраска, расположение клеток, величина периветеллинового пространства и вид неповрежденной зоны пеллюцида. При этом важнейшим критерием для оценки качества эмбрионов является интенсивность развития по стадиям. Эмбрионы с замедленным развитием в биотехнологических исследованиях не используются.

Таким образом, за основу оценки качества эмбрионов приняты четыре признака: 1) целостность зоны пеллюцида; 2) состояние бластомеров; 3) морфология эмбриона и 4) стадия развития. "Идеальный" эмбрион должен быть компактным, сферической формы, с однородной окраской, с клетками одинаковой величины, с гладкой, плоской и равномерно сформированной зоной пеллюцида, без включений в периветеллиновом пространстве.

11.2. Селекция и отбор гамет и эмбрионов

Селекция и отбор фолликулов. Перед культивированием *in vitro* извлеченные фолликулы классифицируются в зависимости от их размеров и числа слоев фолликулярных клеток. В связи с этим выделяют восемь стадий развития фолликул:

1) примордиальный фолликул (несколько фолликулярных клеток вокруг ооцита);

2) сплошной слой фолликулярных клеток (0,4 - 0,5 мм в диаметре);

3) один слой кубических фолликулярных клеток (0,5 - 0,7 мм в диаметре);

4) два слоя фолликулярных клеток (0,7 - 0,8 мм в диаметре);

5) предантральный фолликул, имеющий много слоев фолликулярных клеток, но антрум еще не образовался (0,8 - 2,0 мм в диаметре);

6) антральный фолликул, в котором происходит образование антральной полости (2,0 - 2,5 мм в диаметре);

7) преовуляторный фолликул, в нем образовавшийся антрум среднего размера (от 2,5 - 3,0 мм до 1,0 - 1,8 см в диаметре);

8) овуляторный фолликул с большим антрумом, истонченной стенкой, готовый к овуляции (зрелый Графов пузырек; в диаметре, в зависимости от видовой принадлежности, достигает 3,0 мм - 1,0 (2,8) см).

Такой классификацией удобно пользоваться при изучении фолликулогенеза и оогенеза, когда необходимо детально проследить за ходом клеточного развития.

По другой, более упрощенной версии, различают первичные, вторичные и третичные (Графов пузырек) фолликулы. В этом случае с 1-го по 4-ый класс относят к первичному, с 5-го по 6-ый – вторичному и с 7-го по 8-й класс – третичному фолликулу.

С целью культивирования изолированных ооцитов применяют фолликулы, находящиеся на 7 или 8 стадиях развития, в этом случае их диаметр колеблется в пределах 2,5 - 5 мм - 1,0 - 2,2(2,8) см, что зависит от видовой принадлежности. Если ооциты извлекаются из фолликулов 7 уровня развития, то время культивирования для них составляет 12 - 24 ч, а из фолликулов 8 уровня развития – 6 - 12ч.

При культивировании ооцитов в фолликулах при *in vitro* используются фолликулы, относящиеся к последним четырем классам (с 5 класса). Диаметр таких фолликулов, в зависимости от стадии их развития, находится в пределах от 0,8 - 3,0 мм до 2,2 - 2,8 см. Время культивирования *in vitro* для таких фолликулов составляет для грызунов - 6 - 12, овец и коров - 12 - 26, кобыл - 18 - 30 и свиней - 24 - 36 часов.

Наиболее гомогенная популяция ооцитов может быть получена при их выделении из преовуляторных фолликулов гормонально подготовленных животных. Все (или почти все) такие ооциты способны завершать созревание в «культуре».

Селекция и отбор сперматозоидов. При эмбриокультуральных исследованиях с целью экстракорпорального оплодотворения используют сперму барана с оценкой не ниже Г - 9, быка и хряка – Г и С не ниже 9 баллов, жеребца – Г и С не ниже 8 баллов. Для разбавления с целью искусственного осеме-

нения и хранения допускают сперму барана не ниже Г - 9, быка и хряка – Г и С не ниже 8 баллов, жеребца – Г и С не ниже 6 баллов.

После оценки качества спермы приступают к изучению самих сперматозоидов. Благодаря такому анализу обнаруживают наличие патологических форм. Так, если в составе спермы обнаруживают большое количество круглых клеток, то образец обязательно подвергается бактериологическому контролю и такая сперма в итоге, для экстракорпорального оплодотворения не используется. В зависимости от морфологии сперматозоиды могут быть нормальными и аномальными.

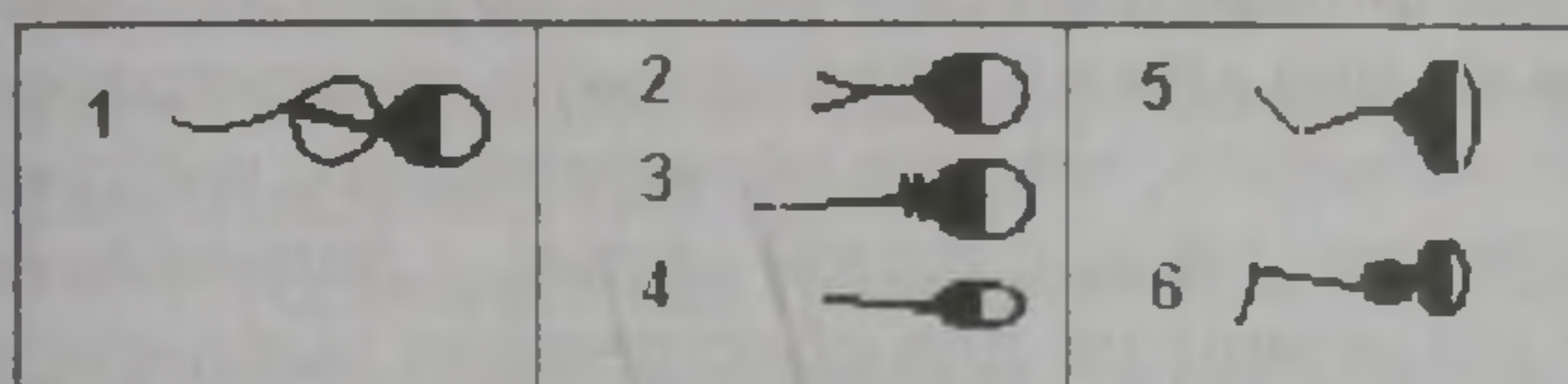


Рисунок 11.4. Схематическое изображение аномальных сперматозоидов: 1- незрелые; 2-4 – дефектные (шейка, средняя часть, размер); 5-6 – с измененной формой (вакуолизированные, грушевидные).

В зависимости от патологии у сперматозоидов различают три группы аномалий: 1) незрелые сперматозоиды, 2) дефектные и 3) сперматозоиды, имеющие измененную форму, которая для них не свойственна (рис.11.4.). Для незрелых сперматозоидов характерно либо отсутствие овальной формы, либо не сформирована шейка или хвост.

В аномальных сперматозоидах присутствуют морфологические дефекты. Поэтому различают следующие классы аномалий в строении сперматозоидов: 1) сперматозоиды с дефектными размерами; 2) сперматозоиды с дефектной средней частью; 3) сросшиеся сперматозоиды. Сперматозоиды с несвойственной для них формой: вакуолизированные, конические, грушевидные, бесформенные.

Таблица 11.4. "Нормальная" характеристика спермы

Показатель	Видовая принадлежность		
	бык	баран	хряк
Объем, мл	4 - 5	1 - 1.5	250 - 400
Время разжижения	В пределах 30 минут		
Концентрация, млрд. мл	1-2	2-4	0.1 - 0.2
Подвижность	80% сперматозоидов обладают ПП движением	90% сперматозоидов обладают ПП движением	80% сперматозоидов обладают ПП движением
Морфология	75% сперматозоидов имеют нормальную форму	85% сперматозоидов имеют нормальную форму	70% сперматозоидов имеют нормальную форму

Нормальные сперматозоиды имеют расширенную головку, за которым следует сильно вытянутый и по длине во много раз превосходящий головку хвост. Для эмбриокультуральных исследований применяют только нормальные сперматозоиды.

Из всего вышеизложенного следует что, несмотря на недостаточную четкость в определении критериев "нормальности" спермы, рекомендуются стандарты (табл. 11.4.), характеризующие "нормальный" образец для эмбриокультуральных исследований.

Селекция и отбор эмбрионов. Для оценки качества эмбрионов, разработанные системы отличаются по принципам сортировки, но все они основаны на разделении эмбрионов на два класса: пригодные и не пригодные для трансплантации. Не следует забывать, что все манипуляции с эмбрионами в условиях *in vitro* осуществляют лишь с одной целью – дальнейшей пересадки в гениталии самок - реципиентов для обеспечения эмбрионам естественных инкубационных условий развития, которая обязательно должна завершиться рождением приплода.

Применяемая оценивающая система для определения качества эмбрионов по морфологическим признакам и прохождению стадий развития различна:

1. 2-х балльная система, в которой эмбрионы классифицируются на две категории: биологически полноценные (пригодны для трансплантации) и биологически неполноценные (не пригодны для трансплантации). При этом к биологически неполноценным эмбрионам относят неоплодотворенные ооциты, дегенерированные эмбрионы, эмбрионы, отстающие в развитии и эмбрионы с нарушенной морфологией. Биологически полноценными являются эмбрионы, имеющие сферическую форму, компактный объем, плоскую и равномерно сформированную зону пеллюцида, без включений в периветеллиновом пространстве и когда внутреннее пространство эмбриона равномерно заполнено бластомерами одинаковой величины.

2. 3-х балльная система, в которой эмбрионы классифицируются на три категории: нормальные по качеству, сомнительные и дегенерированные. Нормальные по качеству – это эмбрионы с хорошо выраженными правильными морфологическими показателями и имеющие правильные темпы развития. К сомнительным эмбрионам относят те, которые либо отстают в развитии, либо, наоборот, опережают развитие по темпам дробления. В данном случае сомнительные эмбрионы используются для трансплантации, но ни в коем случае эти эмбрионы нельзя использовать для эмбриокультуральных и эмбриоинженерных манипуляций. Дегенерированные эмбрионы имеют явные морфологические отклонения, связанные с отсутствием развития. Эмбрионы этой категории для пересадки реципиентам не используются.

3. 4-х балльная система, в которой эмбрионы классифицируются на 4 категории: превосходные, хорошие, посредственные и плохие. Для трансплантации используют эмбрионы, оцененные как превосходные и хорошие. Для эмбриокультуральных и эмбриоинженерных исследований используют только превосходные по качеству эмбрионы. Посредственные и плохие эмбрионы бракуются сразу после оценки.

4. 5-ти балльная система, в которой эмбрионы классифицируются на 5 категорий: наилучшие; хорошие; хорошие, но запоздалые в развитии; удовлетворительные и наихудшие. Для трансплантации используют эмбрионы, оцененные по трем категориям – это наилучшие, хорошие и хорошие, но с запоздалыми темпами дробления. Для эмбриокультуральных и эмбриоинженерных исследований используют только наилучшие по качеству эмбрионы. Удовлетворительные и наихудшие по качеству эмбрионы полностью игнорируются и в опыте не используются.

Из всего вышеизложенного следует, что умеренное отставание в развитии для эмбрионов не всегда может завершаться блокированием. Гетерогенную популяцию эмбрионов при вымывании получают благодаря следующим особенностям:

1. Гормональная насыщенность в организме суперовулированной самки, которая сопровождается следующими физиологическими изменениями: 1) в рост и развитие вовлекается дополнительное число фолликулов яичника; 2) ускоряется темп роста и развития фолликулов, ооцитов, а в дальнейшем, и эмбрионов; 3) по продолжительности удлиняется период эструса.

2. При осеменении суперовулированных самок-доноров в связи с их гормональной насыщенностью необходимо увеличить кратность покрытия до 2 - 4 раз с интервалом в 10 - 12 часов. Благодаря этому овулированные ооциты оплодотворяются в течение 24 - 48 часов.

Все это в комплексе приводит к получению при вымывании гетерогенных по стадиям развития эмбрионов. Поэтому часто эмбрионы, оцененные как сомнительные из-за отставания или опережения темпов дробления при развитии, используются для трансплантации, но при условии, что они имеют хорошие морфологические показатели.

Таким образом, популяция эмбрионов, полученная в результате осеменения *in vivo*, гетерогенна, поэтому время после начала охоты и время, прошедшее с момента оплодотворения, не могут быть признаны адекватными критериями начала развития. Более разумно выбрать для отбора морфологический критерий, анализировать через определенные промежутки времени (например, через каждые 12 часов при вымывании от гомогенных по циклу самок, подвергших суперовуляции и культивировании *in vitro*) и отбирать те эмбрионы, которые в выделенный интервал времени достигли "стандартной" стадии развития. Так можно отобрать группы эмбрионов с одинаковым темпом развития:

1. **Дробление.** Число клеток легко подсчитать вплоть до стадии компактизации (8 клеток), затем клеточные границы перестают быть четкими, так как внутренняя гетерогенность времени дробления обуславливает десинхронизацию каждого последующего дробления.

Клеточные и молекулярные события предимплантационного развития осуществляются в эмбрионе в строгой последовательности. О временном их контроле известно очень мало, однако можно предположить существование, по меньшей мере, двух "часов": один из них — это клеточный цикл, а

второй – гормональный статус организма беременной самки в регуляции предимплантационного развития эмбриона. Анализ механизмов временно-го контроля требует синхронизированной популяции клеток и эмбрионов. Дробление — процесс асинхронный, и по мере развития степень их асинхронности возрастает.

2. *Компактизация.* Процесс уплощения клеток обычно происходит через 4 — 8 ч. после начала 8 - клеточной стадии (4-клеточный цикл). Его можно считать удобной отправной точкой для определения последовательности стадий развития (при некоторой тренировке компактизация выявляется вполне объективно).

3. *Деление, приводящее к 16-клеточной стадии* (конец 4-го и начало 5-го цикла). Эта стадия характеризуется декомпактизацией перед митозом и рекомпактизацией по завершении цитокинеза. Регулярные наблюдения над поздними 8-клеточными эмбрионами дают возможность выявить субпопуляцию новообразованных 16-клеточных эмбрионов.

4. *Формирование бластоцеля* (6-й клеточный цикл). Наиболее раннее свидетельство транспорта жидкости можно заметить на 32 -клеточной стадии, когда образуется наполненная жидкостью вакуоль (иногда две вакуоли, которые увеличиваются и затем сливаются). Следовательно, отбор по этому признаку даст популяцию эмбрионов, начавших формировать бластоцель и проходящих свой шестой клеточный цикл.

В среднем (видовая особенность для основных видов сельскохозяйственных животных не учитывается), хронологию для эмбрионов при их вымывании можно представить следующим образом:

1. При вымывании эмбрионов на второй день после начала охоты 90% эмбрионов находятся на стадии зиготы. Для получения зигот на стадии двух пронуклеусов “идеальным” пусковым отсчетом для извлечения служит время от начала предполагаемого оплодотворения *in vivo*. В этом случае зиготы желателно извлекать из гениталий через 12 часов после последнего покрытия производителем. При этом от всех полученных эмбрионов число дегенерированных составит не более 5%.

2. При вымывании эмбрионов на третий день после начала охоты 20% эмбрионов находятся на стадии зиготы, 55% на стадии 2-х бластомер, 20% - 4-х бластомер и 5% - 6-ти – 8-ми бластомер; при этом от всех полученных эмбрионов число дегенерированных составит уже 7-10%. В этот день для трансплантации отбирают эмбрионы на всех стадиях развития.

3. При вымывании эмбрионов на четвертый день после начала охоты 10% эмбрионов находится на стадии 2-х бластомер, 40% - 4-х бластомер, 30% - 6-ти – 8-ми бластомер, 15% - на стадии морулы и 5% - на стадии ранней бластоцисты. При этом от всех полученных эмбрионов число дегенерированных увеличится до 15-17%. Для трансплантации более желателно в этот день отбирать эмбрионы на стадиях 4-х – 16-ти бластомер. Эмбрионы на стадиях двух бластомер и ранней бластоцисты по качеству сомнительны, так как первые отстают в развитии, а вторые – опережают развитие по темпам дробления. Но если по морфологическим критериям отбора они отнесены к

биологически полноценным, то для трансплантации эти эмбрионы используются.

4. При вымывании эмбрионов на пятый день после начала охоты 1-5% на стадии 2-х бластомер, 5-10% - 4-х бластомер, 20% - 6-ти – 8-ми бластомер, 20% - на стадии ранней морулы, 20% - поздней морулы и 5% - на стадии ранней бластоцисты; при этом от всех полученных эмбрионов число дегенерированных увеличится до 20%. В этом случае для трансплантации используют эмбрионы на стадиях 6-ти – 8-ми бластомер, морулы и бластоцисты. Эмбрионы на стадии 2-х бластомер очень даже сомнительны, так как они уже явно отстают в развитии.

5. При вымывании эмбрионов на шестой день после начала охоты 5% - на стадии 8-ми – бластомер, 20% - на стадии ранней морулы, 40% - поздней морулы и 35% - на стадии ранней бластоцисты; при этом от всех полученных эмбрионов число дегенерированных увеличится до 22-25%. В этом случае для трансплантации используют эмбрионы на стадиях морулы и бластоцисты.

6. При вымывании эмбрионов на седьмой день после начала охоты 10% - на стадии ранней морулы, 20% - поздней морулы и 50% - на стадии ранней бластоцисты; 20% - на стадии экспандированной бластоцисты; при этом от всех полученных эмбрионов число дегенерированных увеличится до 25-27%. В этом случае, также как и в предыдущем, для трансплантации используют эмбрионы на стадиях морулы и бластоцисты.

7. При вымывании эмбрионов на восьмой день после начала охоты 5% - на стадии ранней морулы, 10% - поздней морулы и 30% - на стадии ранней бластоцисты; 50% - на стадии экспандированной бластоцисты; 5% - на стадии вылупляющейся бластоцисты. При этом от всех полученных эмбрионов число дегенерированных увеличится до 30%. Для трансплантации используются эмбрионы от стадии морулы до стадии экспандированной бластоцисты. Вылупляющиеся и вылупившиеся из зоны пеллюцида эмбрионы для трансплантации не используются, так как время необходимое для адаптации в "приемной инкубационной среде" недостаточно для эмбриона. Но в последнее время эксперименты, связанные с пересадкой вылупившихся эмбрионов увеличиваются в связи с клеточными микроманипуляциями, проводимыми на уровне эмбрионов. И все же при эмбриоинженерных исследованиях более предпочтительным для пересадки остается для эмбрионов стадия экспандированной бластоцисты.

В главе 9 этот вопрос был рассмотрен более подробно (табл.9.4.). Сведения, представленные в таблице 9.4. отличаются от данных, представленных в этом разделе. Эту разницу можно объяснить тем, что в таблице 9.4. (глава 9) приводятся усредненные сведения по всем млекопитающим, используемым для биотехнологических исследований в животноводстве (лабораторные и сельскохозяйственные животные), а в этом разделе – усредненные показатели только по сельскохозяйственным животным.

Таким образом, популяции на нужной стадии должны извлекаться из яйцеводов или рогов матки через определенное время после начала охоты (пос-

ледного покрытия) или оплодотворения *in vivo*. Однако эта точность весьма абстрактна, если учитывать межэмбриональные и внутриэмбриональные вариации темпов развития, выражающиеся в морфологических особенностях стадий или в стадиях клеточного цикла.

Возрастная гетерогенность эмбрионов объясняется асинхронностью оплодотворения, а вариации стадий клеточного цикла связаны с внутренними, генетическими различиями между бластомерами.

Кроме того, число дегенерированных эмбрионов повышается по мере увеличения сроков извлечения, начиная с 3-го дня после последнего покрытия производителем. Это указывает на то, что отклонения от нормы у эмбрионов происходят из-за воздействия высоких концентраций овариальных стероидов.

Для предимплантационного развития эмбрионов "критическими периодами" являются стадии двух, восьми и шестнадцати бластомер. Двуклеточный блок в развитии происходит чаще всего на стадии G₂ второго клеточного цикла. Свойство эмбрионов останавливаться в развитии на стадии двух клеток определяется исключительно генотипом ооцита и не зависит от генома отца и эмбриона. Если эмбрионы вымывать на стадии G₂ второго клеточного цикла, то в условиях *in vitro* у более чем 30% наступает блокирование в развитии. Поэтому желательно эмбрионы на стадии двух бластомер извлекать из репродуктивного тракта на более поздних стадиях второго клеточного цикла.

На стадии 8 - 16-ти бластомер происходит важное для биологии вида преобразование – компактизация и поляризация. Если эмбрион успешно проходит через данные процессы, то формируется, в дальнейшем, полноценная бластоциста, если же нет – то бластоциста может и не образоваться в связи с блокированием. Именно стадия 8-16-ти бластомер является предопределяющей для дифференциации, что очень важно для полноценного развития любого индивида.

Как уже было отмечено выше, балльная шкала оценки эмбрионов рассматривает следующие показатели: соответствие стадии развития эмбриона его возрасту; правильности формы зоны пеллюцида и ее целостности; равномерности дробления бластомеров, состояния цитоплазмы; прозрачности периветеллинового пространства. Установлено, что балльная оценка высоко коррелирует с беременностью самок-реципиентов.

После того, как эмбрионы в зависимости от биологической полноценности будут разделены на два класса (пригодные и непригодные для пересадки) их начинают изучать по стадиям развития в следующей последовательности:

1. Для биологически полноценных эмбрионов:
 - 1.1. Классифицируют по стадиям развития.
 - 1.2. Определяют процентное соотношение эмбрионов в зависимости от их стадий развития.
 - 1.3. Сравнивают полученные стадии развития с "биологическими часами".
 - 1.4. При использовании методов количественной биологии определяют: 1) из расчета на донора выход эмбрионов в зависимости от их стадий

развития; 2) влияние экзогенных (при *in vitro*) и эндогенных факторов (при *in vivo*) на эмбриональное развитие *in vitro*; 3) взаимозависимость между стадиями развития.

2. Для биологически неполноценных эмбрионов:

2.1. Классифицируют по стадиям развития.

2.2. Определяют процент потерь в зависимости от стадий их развития.

2.3. При использовании методов количественной биологии определяют: 1) из расчета на донора выход неполноценных эмбрионов в зависимости от их стадий развития; 2) влияние экзогенных и эндогенных факторов на эмбриональное блокирование *in vitro*; 3) взаимосвязь между биологически полноценными и неполноценными эмбрионами.

11.3. КУЛЬТИВИРОВАНИЕ ГАМЕТ

Культивирование – это метод, в котором гаметы и эмбрионы помещаются в среду естественного или искусственного происхождения с целью обеспечения им условий для сохранения жизненных функций, а также для созревания и развития.

В животноводческой практике используют два метода культивирования гамет: *in vivo* (в организме животного) и *in vitro* (в пробирке с использованием питательных сред).

Метод культивирования ооцитов был внедрен в животноводство благодаря биологическим и технологическим предпосылкам. Биологические предпосылки для культивирования ооцитов следующие:

1. Огромный запас ооцитов в яичниках.

2. Созревание ооцитов в фолликулах.

3. Гормоны репродукции.

Технологические предпосылки для культивирования ооцитов:

1. Микроскопическая техника с программным обеспечением, с помощью которой можно проследить за развитием ооцитов *in vitro*.

2. Питательная среда, которая обеспечивает всем необходимым для нормального созревания *in vitro*.

3. Термостат – инкубатор с программным обеспечением, с помощью которого можно создать все внешние условия для созревания ооцитов.

Культивирование in vivo. В животноводстве с целью культивирования ооцитов *in vivo* высокопродуктивные самки животных обрабатываются гормональными препаратами для получения в один половой цикл множественной овуляции (суперовулированный фолликулогенез). Более подробно этот вопрос изложен в восьмой главе учебника (суперовуляция).

Трудным звеном при культивировании ооцитов *in vivo* является время извлечения овулировавших ооцитов. Во избежание не дозрелости или перезрелости необходимо учитывать как длительность овуляционного периода, который, в среднем, длится у сельскохозяйственных животных 24 часа после пика ЛГ, так и оплодотворяющую способность, которая строго лимитирована. Зрелые ооциты извлекаются из яичников, а овулировавшие - из

фаллопиевых труб самок животных различными методами (лапароскопический, трансвезикальный, трансвагинальный, трансуретральный с использованием ультразвукового просвечивания яичников).

Преимуществом метода культивирования *in vivo* является то, что процессы созревания ооцитов происходят в естественных условиях, что важно для дальнейшего развития оплодотворенной яйцеклетки. Кроме того, созревание ооцитов в естественных условиях способствует, в дальнейшем, большему получению полноценных эмбрионов для трансплантации.

Следует отметить, что в животноводческой практике культивирование сперматозоидов не проводят. Это объясняется тем, что запас сперматозоидов у самцов достаточен для проведения селекционной работы. Если производитель имеет высокую продуктивность, но при этом обладает низкими показателями качества спермы и, следовательно, сперматозоидов, он выбраковывается и в воспроизводстве не используется.

Культивирование in vitro – это метод, в котором фолликулы или изолированные из них ооциты помещаются в питательную среду с целью обеспечения им развития и созревания. Методика культивирования складывается из следующих обязательных процедур:

1. Извлечение ооцитов из фолликул яичника или выделение из яичников самих фолликул.

Для выделения ооцитов из фолликул у сельскохозяйственных животных используют яичники от самок, подвергших убою на мясокомбинате. У лабораторных животных используются яичники, извлеченные оперативным путем. Если яичники берут от самок, подвергших убою на мясокомбинате, то их необходимо в течение 1,5 - 2 часов держать в солевом растворе Хэнкса с добавлением антибиотиков при температуре 3 - 10°C. Только после этого мероприятия можно извлекать ооциты.

2. Отбор фолликул. Для культивирования применяют фолликулы диаметром не менее 2 – 3 мм.

3. Культивирование *in vitro*. При культивировании ооцитов *in vitro* применяют три метода: культивирование изолированных ооцитов, культивирование тубальных ооцитов и культивирование ооцитов в фолликулах.

При культивировании необходимо учитывать три процесса созревания, протекающих в ооцитах — это ядерное, цитоплазматическое и мембранное. Так, при отсутствии в культуральной среде гормонов полового цикла происходит только созревание ядра без участия цитоплазмы и мембран. В итоге такие ооциты не способны к дальнейшему развитию после оплодотворения. Поэтому, чтобы обеспечить полноценное созревание ооцитов необходимо наличие всех ингредиентов естественного полового цикла самок животных, включая и клетки кумулюса, которые играют важную роль для мембранного и цитоплазматического созревания ооцитов.

Первый метод культивирования применяют в случаях, когда необходимо ооциты оплодотворить в условиях *in vivo*.

При первом методе культивирования ооциты должны извлекаться из антральных фолликулов, размер которых, в зависимости от вида животных, ко-

леблется в пределах от 2,5 – 5 мм до 2,2 - 2,8 см. В среднем, размер предовуляторного фолликула довольно крупный (его средний диаметр равен 0,5 – 2,0 (2,8)см, что объясняется содержанием жидкости в объеме от 1 до 5 (10) мл.

Методика получения ооцитов сводится к следующему: яичники помещают в чашки Петри с питательным раствором, осторожно выделяют фолликулы нужных размеров, выделенные фолликулы переносят на предметное стекло с лункой и под микроскопом с помощью отсасывающей пипетки путем рассечения фолликул лезвием осторожно извлекают ооциты. Полученные ооциты культивируют в инкубационном термостате в чашках Петри при температуре 37,5°C.

В процессе культивирования *in vitro* ооциты проходят стадию созревания от диплономы до метафазы II мейоза в течение 18 - 30 часов, что зависит от видовой принадлежности. Для основных видов сельскохозяйственных животных время культивирования составляет 8(16) - 26 часов. Полученные таким образом яйцеклетки необходимо использовать для оплодотворения *in vivo* немедленно, т.к. известно, что оплодотворяющая способность ооцитов строго лимитировано и составляет, в среднем, 16 ч, а затем в ядрах происходит дегенерация хромосом, что приводит яйцеклетку к гибели.

Второй метод культивирования применяют в случаях, когда необходимо использовать экстракорпоральное оплодотворение. Суть второго метода сводится к тому, что ооциты извлеченные из предовуляторного фолликула на стадии метафазы II, помещаются в 2 мл «культуры» по 40 штук на 24 - 26 ч. После чего такие ооциты используются для экстракорпорального оплодотворения.

Наиболее популярным является третий метод культивирования ооцитов, а именно культивирование ооцитов внутри фолликул. Данный метод культивирования ооцитов дает возможность сохранить физиологическую взаимосвязь между ооцитом и соматическими элементами самого фолликула. Сам фолликул здесь выступает как «биофабрика стероидных гормонов». Литературные данные свидетельствуют о том, что созревание ооцитов внутри фолликул, в отличие от культивирования изолированных ооцитов, происходит только в средах, содержащих необходимое сочетание гормонов. При культивировании ооцитов внутри фолликул без добавления в среду гормонов реинициации мейоза не происходит, и развитие ооцитов блокируется на стадии диплономы.

В настоящее время используются три различных способа культивирования ооцитов внутри фолликул:

- статический метод, который используется при культивировании фолликул в группах;
- метод ройллерной установки, где каждый фолликул культивируется отдельно;
- метод проточной системы, где несколько фолликул, находящиеся на одной стадии развития помещаются «в культуру», в которую постоянно поступают новые микропорции сред с новым составом и новыми ингредиентами.

Каждый из этих методов имеет свои преимущества и недостатки. Так, при статическом методе, «в культуре» одни фолликулы находятся в данный момент в

сильной, а другие - в слабой степени атрезии. Фолликул, где атрезия достигла необратимой стадии, будет выделять в «культуру» продукты дегенерации, которые губительно влияют на созревание «нормальных» фолликулов. Данный метод широко используется в производственных условиях, где нужна оперативность.

Таблица 11.5. Метод культивирования ооцитов			
№	Характеристика	Метод культивирования	
		In vivo	In vitro
1	Преимущество	Используют гормоны репродукции (экзогормоны).	Возможность контроля и регулирования.
		Ооциты созревают в естественных условиях.	Используют яичники от убитых на мясокомбинате самок животных.
		Множественный фолликулогенез.	Проведение фундаментальных исследований.
		Высокая сохранность ооцитов и полученных от них эмбрионов.	Возможность наблюдения за процессами созревания.
2	Недостаток	Сложна методика извлечения ооцитов.	Низкая сохранность ооцитов.
		Трудно правильно выбрать время для извлечения ооцитов, готовых к овуляции.	Не совершенство питательных сред.
		Повышенный гормональный статус ускоряет темп развития.	Высокий выход ооцитов с аномальным ядерным созреванием.

Метод ройллерной установки чаще применяют для фундаментальных лабораторных исследований, где проводят изучение фолликул и фолликулогенеза.

Резюмируя вышеизложенное, можно прийти к заключению, что для рассмотренных методов культивирования имеются как недостатки, так и преимущества (табл. 11.5.).

Наиболее популярным из этих трех методов является метод проточной системы, где инкубационная среда близка к условиям in vivo.

Общим же для всех этих трех методов является то, что через среду обязательно пропускается газовая смесь в следующих концентрациях: азот - 90%, кислород и углекислый газ - по 5% при температуре 37°C.

В заключении необходимо отметить, что контролирующие механизмы роста фолликула включают сложные, окончательно не изученные взаимодействия между ооцитом и клетками гранулезы, соматическими элементами самого фолликула, разными популяциями фолликул в яичнике, а также взаимоотношения гипоталамуса и гипофиза с яичниками.

4. Использование зрелых ооцитов в оплодотворении для получения эмбрионов на разных стадиях развития.

В настоящее время исследования по культивированию гамет стали актуальными в связи с возросшей потребностью регулирования процессов развития животных на клеточном и молекулярном уровнях. Это объясняется тем, что получение конкурентоспособной животноводческой продукции возможно только в тех случаях, если наравне с традиционными методами селекции применять методы биотехнологии. Благодаря эмбриокультуральным исследованиям в животноводстве возможно:

1. Повысить использование воспроизводительного резерва животных путем увеличения выхода гамет.

2. Проводить «запрограммированное» экстракорпоральное оплодотворение гамет, с целью регулирования пола в животноводстве.

3. Проводить жесткий отбор не только на уровне животных (традиционные методы селекции), но и на уровне гамет и эмбрионов.

4. Создать банк гамет и эмбрионов с целью сохранения генофонда животных.

5. Применить методы эмбриоинженерии с целью получению трансгенных и клонированных животных.

11.4. ОПЛОДОТВОРЕНИЕ ГАМЕТ IN VITRO

Экстракорпоральное оплодотворение (ЭКО) – это процедура, обеспечивающая оплодотворение гамет в условиях *in vitro*, т.е. вне организма животного. При экстракорпоральном оплодотворении основными атрибутами являются пробирка, питательная среда, термостат-инкубатор и подготовленные гаметы.

Оплодотворение гамет в пробирке (*in vitro*) в медицине направлено на борьбу с бесплодием, а в животноводстве – на повышение эффективности разведения сельскохозяйственных животных. Поэтому в животноводстве метод экстракорпорального оплодотворения гамет имеет следующие преимущества:

1. Проведение фундаментальных исследований с целью познания вопросов, касающихся физиологии оплодотворения гамет млекопитающих.

2. Проведение безошибочной оценки оплодотворяющей способности гамет.

3. Повышение эффективности использования сперматозоидов. Так, для успешного оплодотворения одной яйцеклетки концентрация сперматозоидов в условиях *in vivo* должно составлять, в среднем, 6×10^9 , а при *in vitro* – 1×10^6 .

4. Получение предимплантационных эмбрионов животных с заданным генотипом, что означает:

4.1. Получение животных с желаемым полом (ЭКО).

4.2. Получение трансгенных животных (ЭКО и трансгеноз).

4.3. Получение клонированных животных (ЭКО и клонирование).

5. Изучение проблем эмбриональной смертности.

6. Создание банка гамет и эмбрионов с желаемыми свойствами.

7. Получение большого числа эмбрионов с целью ускоренного размножения ценных генотипов животных методами трансплантации.

8. Преодоление многих форм бесплодия.

9. Проведение исследований по клеточной и молекулярной биотехнологии с целью создания конкурентоспособной животноводческой продукции.

После того, как в начале 50-х годов Аустин К.Р. предложил способ капацитации семени «в культуре» начались исследования по культивированию и оплодотворению гамет в условиях *in vitro*. Уже в 1959 году родился первый кролик, в 1978 году – первый младенец человека, в 1981 году – первый теленок, в 1983 году – первый поросенок и в 1984 году – первый ягненок, которые были получены в результате экстракорпорального оплодотворения.

Факторы, определяющие эффективность экстракорпорального оплодотворения гамет:

1. Синхронность цитоплазматического, ядерного и мембранного созревания ооцитов.

2. Морфологическое состояние сперматозоида (зрелость), его способность проникнуть в яйцеклетку (акросомная реакция) и образовать мужской пронуклеус.

3. Прохождение сперматозоидом реакции капацитации. Обычно реакция капацитации для сперматозоидов проходит в гениталиях самки. В искусственных условиях эту реакцию производят в различных питательных средах с использованием синтетических веществ или с добавлением биологических экстрактов полового тракта самки с фолликулярной жидкостью.

4. Согласование сроков отдельного культивирования гамет к моменту их смешивания в микрокапле.

5. Применение сред для оплодотворения. Качественный состав сред должен отвечать всем требованиям, которые имеются при оплодотворении *in vivo*.

6. Объем микрокапель, который не должен превышать 100 мкл.

7. Концентрация гамет в микрокапле для оплодотворения: для сперматозоидов он составляет $1-2 \times 10^6$, а для яйцеклеток – 10-100 штук.

8. Физико-химические условия микрокапель для оплодотворения.

9. Время инкубирования, в течение которого происходит оплодотворение. Оно зависит от видовой принадлежности животного и находится в пределах от 4 до 24 часов.

Таким образом, из вышеперечисленных факторов следует, что в том случае, если яйцеклетка созрела, а сперматозоид претерпел две реакции – капацитацию и акросомную, то происходит нормальный процесс оплодотво-

рения. При нарушении паратипических факторов – оплодотворения не происходит.

Регулирование пола. Как известно, пол у млекопитающих животных зависит от того, какой сперматозоид оплодотворит яйцеклетку. Если яйцеклетка, которая всегда в своем составе несет X-половую хромосому, оплодотворится сперматозоидом с X-половой хромосомой, то образовавшаяся зигота будет развиваться по женскому пути. В случае, когда яйцеклетка оплодотворится сперматозоидом с Y-половой хромосомой, то в этом случае образовавшаяся зигота будет развиваться по мужскому пути. Поэтому, все методики, разработанные на сегодняшний день основаны на разделении сперматозоидов, несущих X- или Y-половые хромосомы. Для этой цели используют несколько методов (центрифугирование, фильтрация, флуоресцентный, иммунологический и метод лазерной обработки), из которых наиболее распространенными являются следующие:

1. Метод центрифугирования и седиментации сперматозоидов. Этот метод основан на разделении сперматозоидов по величине и массе. Установлено, что сперматозоиды с X-половой хромосомой по размеру и массе больше на 2 - 4% по сравнению со сперматозоидами, которые в своем составе несут Y-половую хромосому. Время центрифугирования спермы составляет 15 мин. при 1000 об/мин при температуре 20°C. При этом происходит разделение спермы на две фракции - верхнюю и нижнюю. Осеменение из верхней фракции приводит к рождению высокой доли самцов, а нижней фракции - самок. Этот метод не надежен тем, что в большинстве случаев сперматозоиды с Y-хромосомой легче сперматозоидов с X-хромосомой всего на 2 - 4%. Поэтому результаты сопровождаются большими (до 40%) погрешностями.

2. Метод фильтрации. В основе метода лежит разная подвижность сперматозоидов с разными половыми хромосомами. Сперматозоиды с Y-половыми хромосомами обладают большей подвижностью, чем сперматозоиды с X-половыми хромосомами. В качестве среды, в которой происходит разделение, применяют сывороточный альбумин (БСА). БСА помещают вертикально в колонку с тремя слоями (концентрация БСА увеличивается сверху вниз). При этом в нижней фракции распределяются, в основном, сперматозоиды с Y-половыми хромосомами. Данная методика разделения сперматозоидов также не исключает погрешность, которая составляет, в среднем, 20 - 30%.

3. Метод лазерной обработки. Метод основан на том, что сперматозоиды с X-половыми хромосомами содержат больше ДНК, чем сперматозоиды с Y-половыми хромосомами. Пропуская через лазерный луч и под воздействием положительно и отрицательно заряженных пластин, сперматозоиды отклоняются в соответствующую сторону (заряды клеток зависят от качества и состава ДНК).

При определении пола у зигот и предимплантационных эмбрионов применяют цитогенетический метод. При этом успех анализа заключается в получении хорошо расправленной метафазной пластинки, в которой хромосомы не накладывались бы одна на другую. Более подробную информацию чи-

татель найдет в специальных литературных источниках, где подробно излагаются вопросы цитогенетического анализа.

Техника экстракорпорального оплодотворения гамет. Основные этапы работ, связанные с процессом оплодотворения *in vitro* следующие: 1) подготовительный этап, когда гаметы отдельно культивируются в средах с целью их подготовки, при этом время культивирования между ними согласовано; 2) этап смешивания гамет в микрокапле и их совместная инкубация; 3) тест на оплодотворенность яйцеклетки.

Для успешного экстракорпорального оплодотворения гамет необходимо строго придерживаться методики работ, связанных с этим процессом.

I. Подготовительный этап. Подготовительный этап работы, в свою очередь, состоит из трех основных процедур - это подготовка питательной среды, сперматозоидов и подготовка ооцитов для оплодотворения.

1. Подготовка питательной среды для оплодотворения.

Выбор питательной среды и его физико-химические характеристики играют важную роль при экстракорпоральном оплодотворении и культивировании. Питательная среда должна иметь в своем составе все необходимые компоненты для нормального течения этого процесса. В настоящее время достоверно установлено, что для прохождения таких важных процессов, как капацитация и акросомная реакция необходимо повышенное содержание в среде внутриклеточного кальция. Для этой цели применяют такие питательные среды, как сбалансированный солевой раствор Эрла (EBS), среда 199 и раствор Т6 с концентрацией сыворотки крови матери. Принципы, лежащие в основе приготовления сред для оплодотворения, детально изложены в таблице 5.3. (глава 5). Здесь мы опишем лишь некоторые модификации, которые связаны со спецификой экстракорпорального оплодотворения.

Физико-химический состав. Осмолярность среды должна находиться в пределах 280–290 мОсмоль/мл, иначе оплодотворение может не произойти. Температурные колебания во время манипуляции *in vitro* сводятся к минимуму и находятся на уровне 37 - 37,5°C. pH слабощелочная и находится в интервале 7,2 - 7,4.

Макромолекулы. Как было отмечено выше, к среде для оплодотворения добавляют фракцию БСА или сыворотку крови матери. БСА можно приобрести в готовом виде и хранить замороженным в течение ряда лет. Концентрация же сыворотки в микрокапле для оплодотворения отличается от ее концентрации при культивировании: в первом случае она должна находиться в пределах от 7,5 до 10%, а во втором - от 10 до 15%. Приготовление сыворотки, необходимой для оплодотворения *in vitro*, описано в таблице 5.5 (глава 5).

Вода и масло, которые являются наиболее уязвимыми ингредиентами систем культивирования и оплодотворения. Для оплодотворения желательно использовать воду для инъекций, которая стерильна и не обладает пирогенностью, упакована в подходящих объемах и готовится в строго контролируемых стандартных условиях. Масло используют для предотвращения изменения осмолярности, которое имеет место в результате испарения воды в ходе инкубации. Для этой цели используют легкое парафиновое масло, для которого также необходим жесткий контроль.

Антибиотики добавляют к средам с целью ингибирования роста микроорганизмов. Для этой цели более эффективным является применение гентамицина в концентрации 20 мкг/мл.

2. Подготовка сперматозоидов для оплодотворения.

Окончательное созревание сперматозоида происходит после попадания его в половой тракт самки и заключается в изменении плавательной активности и в преобразовании строения клеточных мембран на его головке.

Сбор образца семени производится путем мастурбации в искусственную вагину. Как известно, семенная жидкость составляет наибольшую часть эякулята и является результатом секреции предстательной железы и семенных пузырьков. Методика определения качества семени и детальный анализ его физико-химических свойств и клеточного состава подробно изложено в первом разделе данной главы. Здесь читатель ознакомится только с непосредственной подготовкой сперматозоидов к экстракорпоральному оплодотворению. Процедура, представляющая собой метод получения фракции, обогащенной подвижными сперматозоидами, называют флотацией (табл. 11.6.).

Таблица 11.6. Метод «флотации» сперматозоидов

№	Процедура
1	Полученный эякулят оставляют при комнатной температуре на 20 - 30 мин. для разжижения. После морфологической оценки помещают в объеме 2 мл в стерильную пластиковую пробирку.
2	Добавляют 10 мл EBS+BCA, осторожно перемешивают пипеткой.
3	Центрифугируют при 200g в течение 5 - 10 мин. Удаляют пастеровской пипеткой верхнюю часть, оставив 0,5 мл. Остаток перемешивают.
4	Осторожно по внутренней стенке пробирки добавляют 1-2мл свежей среды так, чтобы она наслоиась на поверхность суспензии сперматозоидов, для чего пробирку помещают в инкубатор с 5% CO ₂ при 37°C на 20 - 30 мин. В течение этого времени подвижные сперматозоиды мигрируют в наслоенную среду, оставив на дно пробирки мертвые сперматозоиды и иные клетки.
5	Осторожно отсасывают пробу в объеме 0,5 - 1 мл из наслоенной части.
6	Концентрацию суспензии путем разведения доводят до нужной величины в пределах от 2 до 5 млн подвижных сперматозоидов на мл.

3. Подготовка ооцитов для оплодотворения. Процедура работ в этом случае сводится к следующему:

3.1. Яичники, вырезанные у коров, овец или свиней сохраняют в культуральной среде примерно 8 часов при 20°C без утраты способности у ооцитов к созреванию «в культуре». Дозревание ооцитов «в культуре» завершается за 24 - 26 ч. в группах по 40 штук в объеме среды в 2 мл.

3.2. Ооцит выделяют из крупного преовуляторного фолликула диаметром 2,0 - 2,8 см, который содержит 3 - 10 мл жидкости. Ооцит, выделенный из такого фолликула, находится на стадии метафазы II мейоза.

3.3. Выделенный из фолликула ооцит сначала отмывается в чистой капле среды с целью удаления биопримесей, а затем переносится в среду для оплодотворения *in vitro* (1мл. EBS + сыворотка под маслом в течение 12 часов с 5% углекислым газом в воздухе).

3.4. Удаление кумлюсной массы перед добавлением сперматозоидов не производится, т.к. в присутствии сперматозоидов в течение 12 часов клетки кумлюса отделяются спонтанно под действием гиалуронидазы сперматозоидов.

II. Процедуры, связанные с процессом оплодотворения *in vitro* следующие:

За день до оплодотворения.

1. В две чашки Петри пипеткой вносится по 1 мл среды, которые заслаиваются парафиновым маслом. Инкубируют в течение ночи при температуре 37°C в увлажненной атмосфере с 5% углекислым газом в воздухе. Эти камеры будут использованы для начальной дисперсии спермы.

2. Среду, используемую для оплодотворения, обогащают 10мг/мл БСА («Среда»+БСА) или сывороткой крови матери («Среда» + Сыворотка крови матери), стерилизуют фильтрованием и инкубируют всю ночь.

В день оплодотворения.

3. Регулируются физико-химические условия среды с помощью 0,1 NaOH. pH среды доводится до 7,4 (7,6). Осмотическая сила раствора должна составлять 280 - 290 (310) мОсмоль, концентрация углекислого газа в увлажненной газовой смеси должна находиться на уровне 5%. В средах для оплодотворения необходимо присутствие ионов кальция.

4. Приготавливают капли для оплодотворения: а) в пластиковую чашку Петри пипеткой вносится 100 мкл среды; б) погружают (но не закрывают) каплю теплым, прегазованным парафиновым маслом; в) добавляют 300 мкл «Среда» + БСА и, после чего капля наслаивается парафиновым маслом; г) инкубируют пока не будет готова суспензия сперматозоидов.

5. Сперму собирают в капли среды, приготовленные в пункте 1, и инкубируют в течение 25 мин. Концентрация сперматозоидов в аликвоте должна составлять $1-2 \times 10^6$ клеток/мл.

6. Созревшие ооциты (10-100 ооцитов на каплю) переносят в микрокаплю среды. Степень зрелости ооцитов определяется по объему кумлюсной массы или по наличию или отсутствию зародышевого пузырька или полярного тельца (после удаления кумлюса гиалуронидазой). Ооциты выдерживают в инкубаторе с 5% углекислым газом при температуре 37°C в течение 4-5 ч. После чего добавляют капацирированные сперматозоиды. Инкубируют в течение 6 - 24 ч. (время зависит от видовой принадлежности и получения зиготы на определенной стадии развития).

III. Период, после оплодотворения.

7. Извлекают яйцеклетки и определяют, произошло ли оплодотворение по наличию пронуклеусов. Если оплодотворение произошло, через 6 - 12 (14) ч. после оплодотворения в ооплазме должны быть видны 2 пронуклеуса.

8. Оплодотворенные яйцеклетки (зиготу) культивируют *in vivo* или *in vitro*:

8.1. При культивировании *in vivo* используют промежуточных реципиентов. В этом случае в перевязанные лигатурой яйцеводы лабораторных или мелких сельскохозяйственных животных помещают в специальные миниконтейнеры до сотни зигот. В качестве промежуточных реципиентов используют синхронизированных по циклам самок (для лабораторных животных самка должна находиться в стадии эструса).

8.2. При культивировании *in vitro* зиготы с двумя пронуклеусами переносят в капли питательной среды объемом 50 - 100 мкл под маслом и инкубируют в течение 10 - 12 часов с 5% углекислым газом в воздухе. Если развитие идет нормально, то прохождение второй борозды дробления и двух клеточной стадии следует ожидать между 24 и 36 ч. после оплодотворения, а четырехклеточная стадия развития наступает между 32 и 48 ч.

9. Пересадка реципиентам.

В настоящее время успешное оплодотворение *in vitro* осуществляется более чем у двух десятков видов животных и человека.

Первая девочка, искусственно зачатая «в пробирке» (Луиза Браун) родилась в Англии в 1978 г. Сейчас общее число детей, зачатых *in vitro*, достигает в мире более 11000. Общее же число сельскохозяйственных животных, полученных при экстракорпоральном оплодотворении, превысило более 5000.

11.5. Культивирование эмбрионов

Различают два метода культивирования эмбрионов: *in vivo*, *in vitro*.

Культивирование эмбрионов *in vivo*. С целью культивирования эмбрионов *in vivo* применяют «промежуточных» реципиентов. Самка-реципиент является промежуточной, если в ее генитальный аппарат помещаются эмбрионы на непродолжительный срок с целью культивирования (рис. 11.6.). Применение этого метода основано на том, что в течение 1 - 2(3) дней эмбрионы помещаются в ипсилатеральную сторону фаллопиевой трубы самок-реципиентов. При этом различают два метода размещения эмбрионов в фаллопиевой трубе:

1. Свободное размещение эмбрионов в фаллопиевой трубе. В этом случае ипсилатеральная сто-

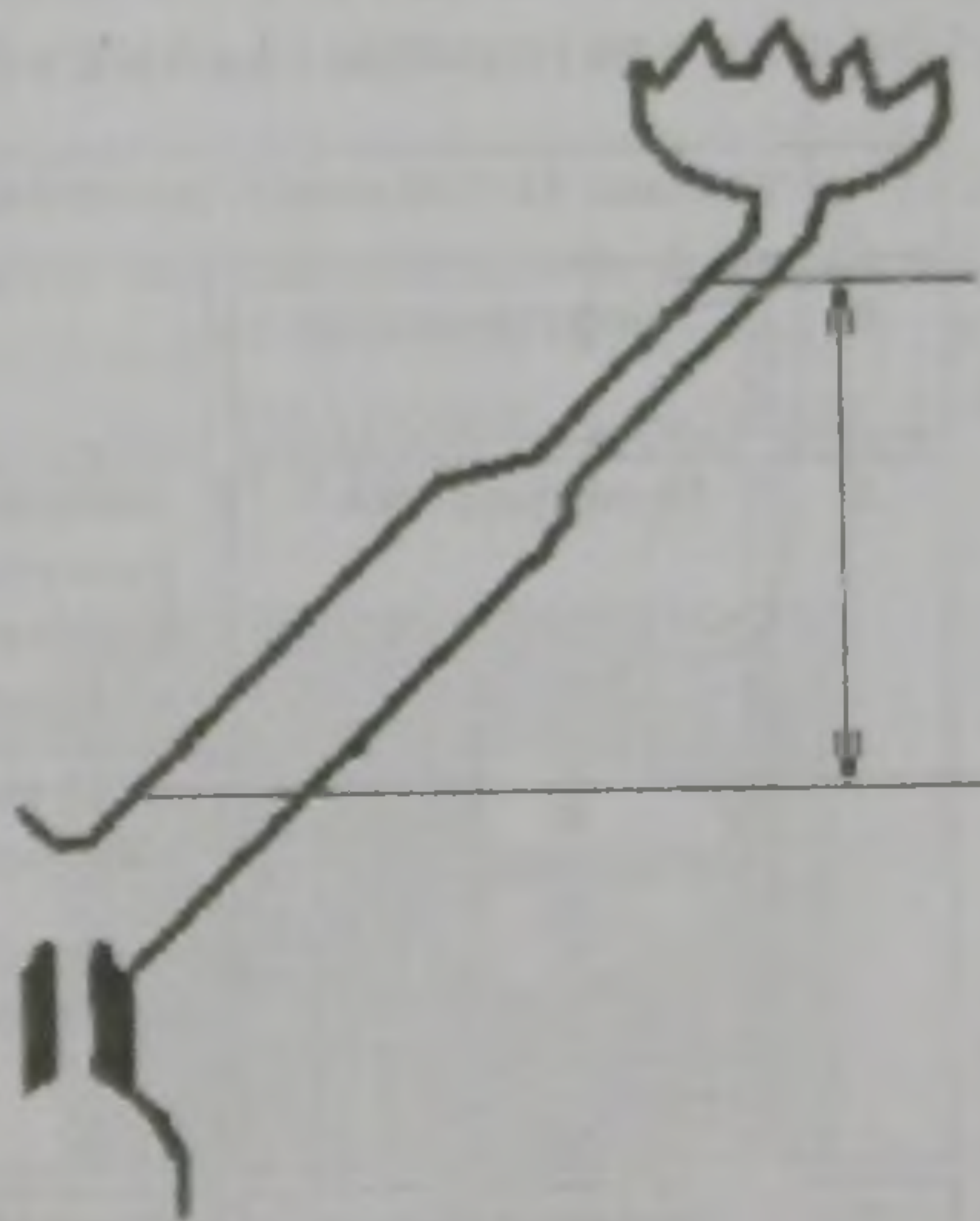


Рисунок 11.5. Культивирование эмбрионов *in vivo*.

Стрелкой указано место, куда помещаются эмбрионы для культивирования. На рисунке представлена упрощенная схема строения гениталий лабораторных грызунов.

рона фаллопиевой трубы фиксируется лигатурой с двух сторон от размещения эмбрионов (от ампулы до истмуса).

2. Эмбрионы по 4 – 6 штук вначале помещаются в специальные микроконтейнеры, а затем эти микроконтейнеры фиксируются в фаллопиевой трубе промежуточного реципиента. Особенность данной методики заключается в том, что микроконтейнеры изготавливаются из проницаемого материала, поэтому питание эмбрионов в связи с поступлением субстратов из полового тракта самок в микроконтейнеры через микропоры ни чем не ограничивается. Данная технология способствует снижению потерь эмбрионов при манипуляциях, связанных с пересадкой и вымыванием при культивировании.

Следовательно, извлеченные из гениталий одних самок эмбрионы могут быть “размещены” в гениталии других самок. Достаточно продолжительный срок культивирования (несколько суток) в гениталиях промежуточного реципиента делает возможной как транспортировку эмбрионов на большие расстояния, в целях широкого и дешевого распространения ценных пород животных, так и пересадки культивируемых эмбрионов в более поздние сроки их развития.

Для сельскохозяйственных животных в качестве промежуточных реципиентов используют самок лабораторных и мелких сельскохозяйственных животных. Так, для эмбрионов крупного рогатого скота чаще используют в качестве промежуточных реципиентов овец или кроликов, для эмбрионов овец и свиней – самок лабораторных животных.

Культивирование эмбрионов in vitro. Для культивирования используют обычно чашки Петри. В этом случае эмбрионы помещаются в микрокаплю по одному или группой (3 - 5 штук).

Таблица 11.7. Метод культивирования эмбрионов			
№	Характеристика	Метод культивирования	
		In vivo	In vitro
1	Преимущество	Эмбрионы продолжают развитие в естественных условиях.	Возможность контроля и регулирования.
		Высокая сохранность эмбрионов.	Проведение фундаментальных исследований.
		Транспортировка.	Возможность наблюдения за процессами развития.
2	Недостаток	Сложна методика, предполагающая применение метода лапаротомии.	Низкая сохранность.
			Не совершенство питательных сред.

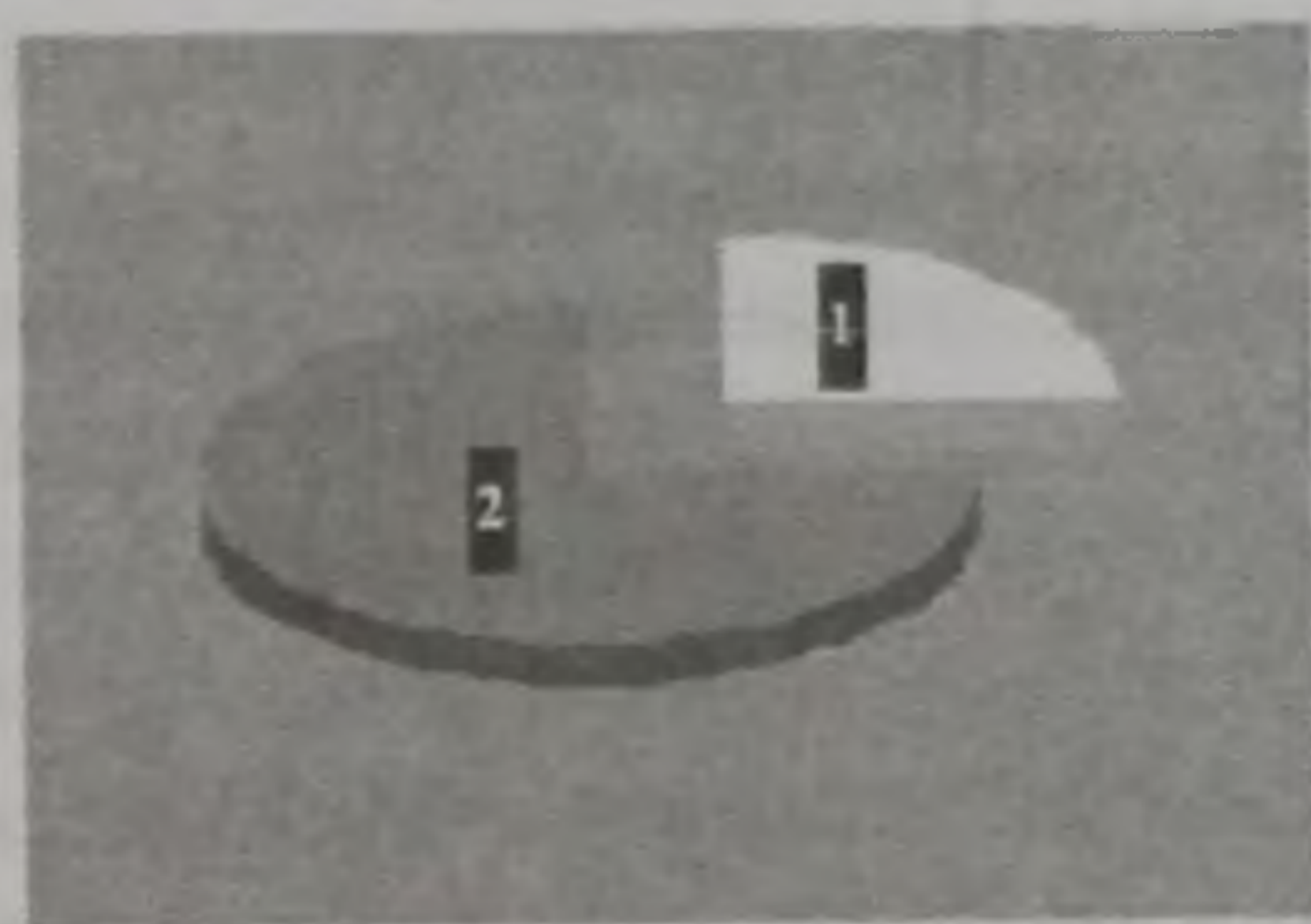
Основной режим микрокапли при культивировании эмбрионов: осмотическое давление –290 мОсмоль/л; температура –37,5°С; pH -7,4;

наличие газовой смеси в микрокапле - 5% кислорода, 90% азота, 5% углекислого газа. Для предотвращения изменения осмолярности, которое имеет место в результате испарения воды в ходе инкубации, на микрокаплю сверху накладывают парафиновое масло. Подготовленная таким образом микрокапля помещается в термостат-инкубатор, в воздухе которого присутствует 5%-ый CO_2 . Время инкубации зависит, во-первых, от видовой принадлежности и, во-вторых, от той стадии развития эмбриона, которую исследователь хочет получить. Но, это не значит, что время при культивировании эмбрионов не имеет ограничений. Чем дольше эмбрион культивируется в условиях *in vitro*, тем больше вероятность того, что в развитии эмбриона наступит блокирование. Это объясняется тем, что до сих пор, многие вопросы (биохимическое и физиологическое регулирование, морфологические контакты и пр.) предимплантационного развития остаются не раскрытыми и, поэтому отмечается "не совершенство" качества используемых сред. Поэтому эмбрионы культивируют в пределах от 6 до 36 часов, так как именно в этих пределах отмечается высокий выход биологически полноценных эмбрионов. При более длительном времени инкубации процент потерь прогрессивно увеличивается.

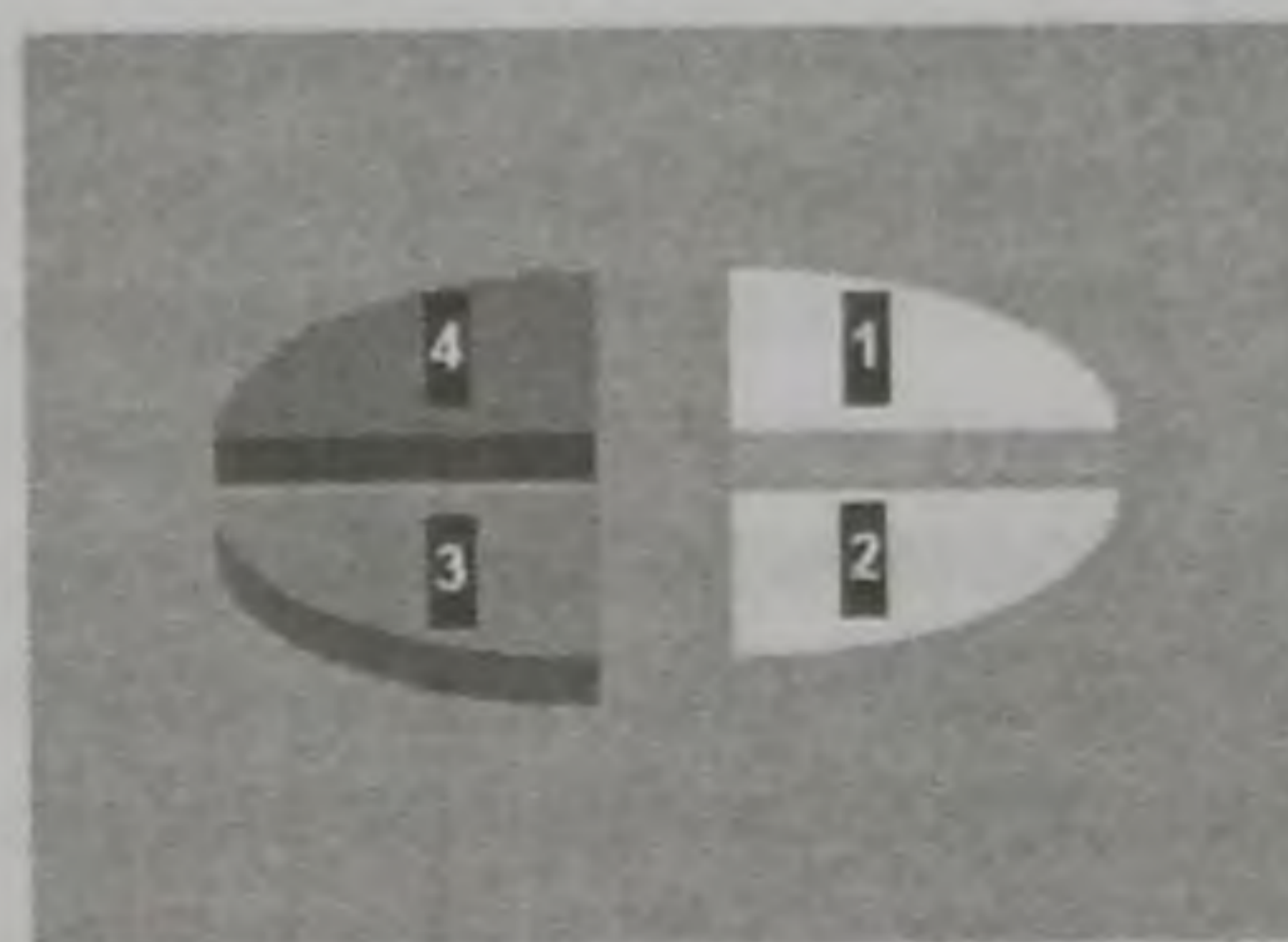
Резюмируя вышеизложенное, можно прийти к заключению, что для рассмотренных методов культивирования эмбрионов имеются как недостатки, так и преимущества (табл. 11.7.).

11.6. Клеточный анализ в животноводстве

Проведение клеточного анализа в биотехнологических исследованиях имеет большое значение для животноводства. При разведении племенных животных с целью улучшения и поддержания их генотипа биотехнолог-селекционер проводит жесткий отбор не только на уровне животных (рис. 11.6.a), но и на уровне гамет и эмбрионов (рис. 11.6.b).



а) 1 – заказное спаривание племенных животных; 2 – селекция и отбор животных.



б) 1 – заказное оплодотворение гамет; 2 – селекция и отбор эмбрионов; 3 – селекция и отбор животных; 4 – селекция и отбор гамет.

Рисунок 11.6. Удельное соотношение работ при разведении племенных животных с применением селекционных (а) и биотехнологических (б) приемов.

как до сих пор нет “идеальной” методики по вызыванию дополнительных овуляций в обычном половом цикле с помощью фармакологических препаратов.

3.3. Раскрывает физиологическую взаимозависимость между донором, эмбрионом, реципиентом и трансплантатом путем определения факторов, способствующих имплантации, развитию, рождению и сохранению приплода.

3.4. Изучает влияние материнского эффекта на рост, развитие и формирование хозяйственно-полезных признаков у трансплантатов.

3.4. Раскрывает генетическую взаимозависимость между производителем, донором, эмбрионом и трансплантатом.

Из всего вышеизложенного следует, что изучение и освоение методик, направленных на использование клеточного резерва животных необходимо проводить на уровне гамет и эмбрионов. При этом получаемые сведения нужно тщательно анализировать с целью предотвращения погрешностей в развитии животных, которые можно получить в условиях *in vitro*.

С практической стороны данный вопрос очень подробно изложен в главах 7 – 9 данного учебника и “Практикуме по биотехнологии животных”.

Резюме

Ознакомившись с содержанием данной главы, Вы убедились, что результаты всех исследований, проводимых по биотехнологии животных, находятся в прямой зависимости от способности трансплантируемых эмбрионов продолжить пренатальное развитие в организме физиологической матери, которое обязательно должно завершиться рождением полноценного организма.

Кроме того, Вы убедились, что при всей “щепетильности” вопросов, связанных с эмбрионами, возможности методов эмбриокультуры обширны. Благодаря методам эмбриокультуры стало возможным размножать высокопродуктивных животных ускоренными темпами. Уникальность пренатального периода развития в начальной стадии определяется тем, что эмбрион должен от места оплодотворения переместиться к месту имплантации. Благодаря такой способности эмбрион в органах репродукции находится несколько дней свободно. Именно это биологическое свойство направило ученых проводить исследования с предимплантационными эмбрионами.

В животноводстве методы эмбриокультуры позволяют:

1. Использовать генетический резерв животных, запрограммированных в репродуктивных клетках с целью их ускоренного размножения.
2. Вовлекать в рост и развитие дополнительное число фолликулов с целью получения полиовуляционной реакции у генетически ценных самок.
3. Проводить “запрограммированное” оплодотворение с целью получения животных определенного пола.

Важным условием для получения желаемых результатов является правильный анализ первичных сведений. Так, при использовании методов воспроизводительной биотехнологии анализ проводят в совокупностях на клеточном, а затем – популяционном уровнях. При этом клеточный анализ проводится в следующей последовательности:

1. Изучение реакции яичников донора на гормональную обработку.

С этой целью необходимо изучить следующие биотехнологические особенности:

1) определить из расчета на донора: число полученных овуляций (уровень суперовуляции), число извлеченных эмбрионов и полученных при этом биологически полноценных эмбрионов;

2) изучить влияние различных факторов на число получаемых овуляций;

3) охарактеризовать взаимозависимость между числом овуляций и полученных при этом биологически полноценных эмбрионов;

4) изучить влияние числа полученных овуляций и других факторов на выход биологически полноценных эмбрионов.

2. Изучение биологической полноценности эмбрионов.

Для этого необходимо:

1) оценить биологическую полноценность эмбрионов;

2) изучить стадию развития эмбрионов в зависимости от времени их вымывания из гениталий донора;

3) выявить факторы, способствующие снижению жизнеспособности эмбрионов;

4) определить процент приживляемости эмбрионов в гениталиях реципиентов;

5) раскрыть причины возникновения эмбриональной смертности;

6) изучить взаимозависимость между донором, эмбрионом, реципиентом и определить факторы, способствующие успешной имплантации и развитию.

3. Эмбриопопуляционный биотехнологический анализ на уровне гамет, эмбрионов, животных и определенных групп животных (например, контрольная и опытная; по направлениям продуктивности и т.д.).

Этот этап в клеточном анализе является заключительным, так как все вышерассмотренные особенности изучаются во взаимосвязи. Проводя этот анализ в своем эксперименте, исследователь изучает следующее:

3.1. Определяет уровень суперовуляции в яичниках гормонально обработанных доноров в зависимости от возрастных, породных и видовых особенностей животных. Уже доказано, что между породами, а также между внутрипородными типами наблюдается значительная вариация по уровню суперовуляции. Именно эти особенности препятствуют в определении точного механизма контроля уровня суперовуляции.

3.2. Выявляет наиболее благоприятную схему гормональной обработки. Благодаря этому анализу исследовательская группа проводит работу по совершенствованию существующих методов вызывания суперовуляции. Эта работа на сегодняшний день является наиболее актуальной, так

Ключевые слова и понятия:

Акрсомная реакция	Оплодотворяющая способность гамет
Активация яйцеклеток	Перемещение гамет к месту оплодотворения
Антральный фолликул	Питательная среда
Графов пузырьек	Преантральный фолликул
Капацитация	Режим культивирования
Классность спермы	Суперовуляция
Культивирование	<i>in vitro</i> , <i>in vivo</i>
Методы культивирования	
Оплодотворение гамет	

Контрольные вопросы:

1. Что подразумевают под понятием «биологическая полноценность гамет»?
2. Что подразумевают под понятием «биологическая неполноценность гамет»?
3. Что подразумевают под понятием «биологическая полноценность эмбрионов»?
4. Что подразумевают под понятием «биологическая неполноценность эмбрионов»?
5. В каких случаях проводят оценку гамет, а в каких – эмбрионов?
6. Какие показатели являются основными при оценке сперматозоидов, ооцитов, фолликулов и эмбрионов?
7. Чем отличается микроскопическое исследование сперматозоидов от макроскопического?
8. Какие методы оценки применяют для гамет и эмбрионов?
9. Что собой представляет биологический стандарт для предимплантационных эмбрионов?
10. Какие стадии развития характерны для предимплантационного эмбриона?
11. Каким образом проводят селекцию и отбор фолликулов, сперматозоидов и эмбрионов?
12. Какие аномалии характерны для сперматозоидов, ооцитов и эмбрионов?
13. Дать определение термину “культивирование”.
14. Какие методы культивирования применяют в животноводстве?
15. В каких случаях культивируют сперматозоиды?
16. Какие преимущества характерны для культивирования *in vivo* и *in vitro*?
17. Какие недостатки характерны для культивирования *in vivo* и *in vitro*?
18. Какие факторы определяют эффективность экстракорпорального оплодотворения?
19. Какие методы используют для регулирования пола при экстракорпоральном оплодотворении?
20. Что собой представляет метод “флотации” сперматозоидов?

4. Культивировать эмбрионы *in vitro* и *in vivo* с целью получения эмбрионов с необходимыми стадиями развития.

5. "Конструировать" генотип животных в заданном направлении с целью получения клонированных животных.

6. Вводить генно - инженерные конструкции в геном эмбриона с целью: 1) ускорения темпа их роста, следовательно, и формирования продуктивных качеств у животных; 2) повышения резистентных качеств у животных; 3) продуцирования ценных генетико-проектируемых продуктов метаболизма.

7. Создавать банк гамет и эмбрионов с целью сохранения генофонда животных.

8. Импортировать и экспортировать животных в виде эмбрионов с целью распространения ценных генотипов.

Пункты 5 и 6 относят к методам эмбриоинженерии, но именно благодаря методам эмбриокультуры Вы можете проводить различные микротехнологии с применением методов клеточной биотехнологии. В целом же, все эти пункты предполагают в завершении применить методы эмбриотрансплантации, которые направлены на получение здорового и полноценного организма-трансплантата. Это еще раз подтверждает, что методы эмбриоинженерии, эмбриокультуры и эмбриотрансплантации не только дополняют друг друга, но и не могут существовать в изоляции друг от друга. Следовательно, эти методы работают на благо только в комплексе. Единственное препятствие для совмещения этих методов при внедрении в практику животноводства сводится к материально-технической базе лаборатории. Если материально-техническая база находится на уровне ниже среднего, то возможности лаборатории сводятся только к применению методов эмбриотрансплантации. Если материально-техническая база лаборатории находится на среднем уровне, то лаборатория успешно применяет методы эмбриотрансплантации в сочетании с методами эмбриокультуры. А если возможности лаборатории находятся на уровне выше среднего, то лаборатория может использовать методы эмбриоинженерии, обеспечивая, тем самым, конвейерную систему исследований.

Методы эмбриокультуры теряют свою ценность в том случае, если эксперимент не заканчивается рождением полноценного организма. Поэтому, проводя эксперименты, связанные с эмбриокультуральными работами следует придерживаться основных правил, которые сводятся к следующим положениям:

1. Все манипуляции, связанные с гаметам и эмбрионами обязательно нужно проводить в стерильных условиях.

2. Создать и обеспечить гаметам и эмбрионам благоприятные условия для сохранения их жизнедеятельности и дальнейшего развития в условиях *in vitro* (и *in vivo*).

Путем оценки, селекции и отбора проводить жесткий контроль качества гамет и эмбрионов после применяемых *in vitro* манипуляций.

Зона низких температур	$(0^{\circ}\text{C}) - (-80^{\circ}\text{C})$	Продолжается переход в состояние переохлаждения и кристаллизации внутриклеточной воды и солей.
Зона ультранизких температур	$(-80^{\circ}\text{C}) - (-150^{\circ}\text{C})$	Происходит полная кристаллизация и рекристаллизация.
Зона покоя	-196	Завершаются кристаллизационные и рекристаллизационные процессы.

При воздействии низкой температуры происходит предельное замедление жизни в результате подавления метаболических реакций (анабиоз). Успех в криоконсервации гамет и эмбрионов невозможен без глубокого познания причин и механизмов повреждения и устойчивости объекта при охлаждении и замерзании.

Процесс замораживания и оттаивания определяется физико-химическими свойствами воды, ее особым поведением при понижении температуры, а на процесс кристаллизации и таяния влияют характер объекта, состав биологической жидкости и скорость охлаждения.

При воздействии на гаметы и эмбрионы низких температур условно различают пять температурных зон (табл. 12.1.).

Вода принимает активную роль во всех жизненных процессах. Клетка животных состоит из 80% воды, из которых 10 - 18% прочно связаны в молекулах. Вода обладает особыми свойствами, из которых наиболее характерными являются следующие: высокие значения точки кипения и замерзания, диэлектрическая проницаемость, способность увеличивать объем при переходе из жидкого в твердое состояние, сжиматься при таянии.

Установлена высокая корреляция между скоростью замораживания, формой кристаллов и выживаемостью биообъектов. Так, при медленном охлаждении гамет и эмбрионов свободная вода вне и внутри клеток затвердевает в виде крупных кристаллов, что приводит их к гибели. Гаметы и эмбрионы гибнут также при быстром погружении в жидкий азот из-за того, что вода не успевает выйти из клетки. При замораживании гамет и эмбрионов процесс образования кристаллов льда начинается в межклеточном пространстве. Это приводит к возрастанию в среде концентраций ионов, вследствие чего клетки начинают обезвоживаться и концентрация солей в них возрастает. С одной стороны, обезвоживание клетки может привести к удалению внутриклеточной воды до такой степени, что это повлечет к формированию неестественных химических связей или переносу компонентов с одной поверхности на другую, а с другой стороны, изначальное обезвоживание предотвращает клетки от разрушающего действия кристаллов льда.

Происходящее повышение концентраций ионов внутри клеток при обезвоживании также допустимо лишь до определенного предела, после чего происходит необратимое нарушение биохимических процессов. Согласно двух-

Рекомендуемая литература. Для изучения вопросов, касающихся эмбриокультуральных исследований можно обратиться к следующим источникам: Де Робертис Э., Новинский В., Саэс Ф. Биология клетки: Пер. с англ. – М.: Мир, 1973; Зенгбуш П. Молекулярная и клеточная биология в 3 т.: Пер. с нем. – М.: Мир, 1982; Каппучинелли П. Подвижность живых клеток: Пер. с англ. – М.: Мир, 1982; Бернет Ф. Клеточная иммунология: Пер. с англ. – М.: Мир, 1971; Гордон Дж. Регуляция функции генов в развитии животных: Пер. с англ. – М.: Мир, 1977; Свенсон К., Уэбстер П. Клетка: Пер. с англ. – М.: Мир, 1990; Де Робертис Э., Новинский В., Саэс Ф. Биология клетки: Пер. с англ. – М.: Мир, 1973; Зенгбуш П. Молекулярная и клеточная биология в 3 т.: Пер. с нем. – М.: Мир, 1982; Каппучинелли П. Подвижность живых клеток: Пер. с англ. – М.: Мир, 1982; Бернет Ф. Клеточная иммунология: Пер. с англ. – М.: Мир, 1971; Гордон Дж. Регуляция функции генов в развитии животных: Пер. с англ. – М.: Мир, 1977; Свенсон К., Уэбстер П. Клетка: Пер. с англ. – М.: Мир, 1990; И.Станек. Эмбриология человека, М., Веда, 1977; Карлсон Б.М. Основы эмбриологии по Пэттену в 2 т.: Пер. с англ. – М.: Мир, 1983.

Глава 12. Криобанк гамет и эмбрионов

Цель: Изучить теоретические аспекты замораживания гамет и эмбрионов и ознакомиться с методами криоконсервации и витрификации.

После изучения главы студент сможет:

- дать определение терминам “криоконсервация”, “криобиология”, “синдинг”, “витрификация”;
- выбрать среды и криопротекторы для замораживания;
- подготовить контейнеры для образцов;
- добавлять криопротекторы перед замораживанием и удалять после оттаивания;
- оценивать жизнеспособность консервированных гамет и эмбрионов.

12.1. Основы криобиологии

Раздел биологии, изучающий факторы воздействия низких и сверхнизких температур на биологические объекты называют *криобиологией*.

Таблица 12.1. Температурные зоны при воздействии на биологический объект низких температур		
Температурная зона	Температурный интервал	Характеристика
Активная зона	(+40 ⁰ С) – (+25 ⁰ С)	Высокая активность обменных процессов.
Промежуточная зона	(+25 ⁰ С) – (–5 ⁰ С)	Понижение уровня обмена и перехода клетки в состояние анабиоза.

2) второй этап – образование кластеров; кластеры – это короткоживущие образования липидных молекул; переход липидов в кластеры нарушает их взаимодействие с белками и дискоординирует работу ферментов;

3) третий этап – literalное разделение;

4) четвертый этап – обратимые или необратимые изменения в белках.

2. Изменение физико-химических факторов - pH, увеличение концентрации электролитов, повышение осмотического давления.

3. Биохимические изменения - активация перекисления липидов, окисление SH-групп (при обезвоживании белковые молекулы сближаются и образуют дисульфидные S-S связи в результате окисления SH-групп или реакции дитиолдисульфидного обмена, что приводит к денатурации белков); активация фотолипаз, разобщение дыхания и фосфолирования.

Мелкие клетки легче переносят замораживание (сперматозоиды), поскольку быстрее обезвоживаются и, следовательно, меньше подвергаются разрушающему действию гипертонических растворов.

Серьезное внимание также уделяется процессу оттаивания, так как в период рекристаллизации, при повышении осмотических нагрузок на мембрану отмечается больше всего повреждений в репродуктивных клетках. Наиболее опасные критические зоны при оттаивании находятся в диапазоне температур от -50°C до -30°C и от -30°C до 0°C . Основные повреждения клеток происходят в результате превышения ими критического максимального объема из-за разбухания после возвращения в изотонические условия.

Таким образом, рассматривая процесс замораживания гамет и эмбрионов во времени, можно выделить три этапа - *охлаждение, замораживание и оттаивание*.

На первом этапе (охлаждение от $+37^{\circ}\text{C}$ до точки кристаллизации) основное значение имеет фактор потери тепла, вызывающий повреждения, связанные с температурным шоком. На этом этапе необходимо медленное охлаждение.

На втором этапе (замораживание) основные повреждения связаны с вне- и внутриклеточным образованием кристаллов льда, действие гиперконцентрированных растворов солей, уменьшением объема клеток в результате дегидратации, сдвигом pH. На этом этапе необходимо применение двухэтапных программ. Начальная скорость должна быть не выше $10^{\circ}\text{C}/\text{мин}$, последующая - выше $100^{\circ}\text{C}/\text{мин}$.

На третьем этапе (отогрев) повреждения связаны с рекристаллизацией и осмотическим стрессом. Скорость оттаивания должна соответствовать скорости замораживания (табл. 12.2.).

12.2. Криоконсервация

Криоконсервация (от греч. – холод, лед) - это метод длительного хранения гамет и эмбрионов путем воздействия на них низких температур. При этом методе гаметы и эмбрионы хранятся в жидком азоте при температуре -196°C .

факторной теории повреждения на первом этапе (от 0 до 7°C) наиболее опасным является фактор, заключающийся в быстрой дегидратации клеток, а на втором (от -7°C и до -50°C) – повышенная концентрация солей. Интенсивность влияния каждого фактора зависит от вида клеток, состава консервирующей среды и скорости замораживания. Поэтому на первом этапе необходима замедленная скорость замораживания, а на втором – повышенная для уменьшения отрицательного действия гиперконцентрации солей.

Таблица 12.2. Схема последовательности криповреждений (Fahy G.M., 1984; Загибаволова Т., 1985)		
№	Процесс	Криповреждение
1	Охлаждение	Нарушение регуляции обмена Изменение структуры липидов
		Нарушение транспорта веществ через плазматические мембраны Набухание, лизис Холодовой шок
		Понижение интенсивности обмена Адаптационные процессы
2	Переохлаждение	Дегидратация клетки
		Сжатие, уменьшение объема клетки
3	Замерзание	Нарушение межмолекулярных, водородных, гидратных и других связей, окисление сульфгидрильных групп, конформационные изменения биополимеров, инактивация ферментов, активация фосфолипаз
		Перераспределение веществ в клетке, контактирование микроструктур, макромолекул в результате дегидратации и кристаллизации
		Рекристаллизация
4	Хранение	В состоянии анабиоза
5	Отогревание	Рекристаллизация
		Образование пузырьков газа и разрыв клеточной оболочки
6	Таяние	Обводнение клетки, нарушение осмотического равновесия, осмотический шок, набухание, лизис

При воздействии на гаметы и эмбрионы низких температур можно наблюдать следующие криповреждения:

1. Ослабление гидрофобных взаимодействий и фазовые переходы липидов. При этом выделяют 4 этапа:

1) первый этап – фазовые переходы из жидкокристаллического состояния в состояние геля; этот этап сопровождается значительными изменениями в структуре мембран;

Метод низкотемпературной консервации гамет и эмбрионов в жидком азоте чрезвычайно важен для развития биологии, животноводства и медицины. Наличие банка гамет и эмбрионов нужных генотипов имеет следующие преимущества в животноводстве:

1. Позволяет не опасаться чрезвычайной утраты ценного генетического материала в результате генетических контаминации или болезней.

2. Способствует упрощению международных перевозок (транспорт гамет и эмбрионов дешевле и гуманней, чем транспорт животных).

3. Снижает жесткость в карантинных ограничениях, т.к. число болезней, переносчиками которых могут быть гаметы и эмбрионы, ниже, чем соответствующий показатель для животных.

4. Способствует селекции высокопродуктивных сельскохозяйственных животных.

Наличие банка гамет и эмбрионов нужных генотипов имеет следующие преимущества в биологии и медицине:

1. Решает проблемы, связанные с бесплодием. При стимуляции множественной овуляции и оплодотворении *in vitro* можно получить несколько (от 2 до 6 - 8) эмбрионов, два из которых можно пересадить в материнский организм (или организм суррогатной матери), а остальные уже заморожено-оттаянные можно использовать для пересадки в последующих циклах, в итоге возможность удачной беременности повышается в 2 - 3 раза.

2. Способствует изучению клеточной реакции на низкие температуры.

Более широкое применение в практике животноводства методы криобиологии получили, когда в начале 70-х годов было получено живое потомство у мышей, которым имплантировались зародыши, длительно хранившиеся при температуре, равном -196°C . На данное время более чем у 20 видов животных получено живое потомство после трансплантации заморожено-оттаянных эмбрионов.

Стадия развития эмбрионов при замораживании. При замораживании используют только свежеполученные гаметы и эмбрионы.

Техника глубокого замораживания зависит от видовой принадлежности и стадии развития эмбрионов. Так, у мышей и крыс лучшие результаты получают при замораживании зародышей на 8-клеточной стадии. У кроликов для замораживания рекомендуют использовать эмбрионы на стадии 8 - 16-ти бластомер и морул. Важным отличием является то, что заморожено-оттаянные эмбрионы кролика не нуждаются в культивировании *in vitro* перед их трансплантацией реципиенту, в то время как эмбрионы мышей необходимо перед пересадкой предварительно культивировать.

У крупного рогатого скота процедуру криозамораживания лучше всего выдерживают бластоцисты. У овец и свиней при замораживании используют обычно эмбрионы на стадии морулы, редко – на стадии бластоцисты.

Криопротектор - это низкомолекулярный неэлектролит, способный проникать через мембрану клетки с целью предохранения их от повреждающего действия высоких концентраций растворов, которые создаются в результате замораживания воды в суспензионной среде. Присутствие криопротектора во время

охлаждения необходимо для выживания гамет и эмбрионов. Известны различные классы веществ (порядка ста) обладающие криозащитными свойствами.

Основные требования к криопротектору, которые необходимо учитывать, следующие: 1) они должны легко проникать в клетки; 2) быстро связывать воду; 3) хорошо растворяться в водных растворах электролитов; 4) способствовать образованию низкоплавких эвтектических смесей; 5) обеспечивать мелкую однородную кристаллизацию льда; 6) иметь низкую молекулярную массу; 7) обладать малой токсичностью в больших концентрациях.

По характеру взаимодействия с клетками все криопротекторы могут быть разделены на две группы:

1) эндоцеллюлярные, которые свободно проникают в клетку (диметилсульфоксид - ДМСО, глицерин);

2) экзоцеллюлярные - не проникающие в клетку, но которые, в свою очередь, делятся на две подгруппы: осмотически активные (сахароза) и осмотически неактивные (поливинилпирролидон - ПВП).

Защитное действие эндоцеллюлярных криопротекторов складывается из ряда факторов:

- являясь хорошими растворителями, они снижают растворимость солей и электролитов до безопасного уровня и, тем самым, смягчают их денатурирующее действие на белковые структуры компонентов клетки;

- способствуя переохлаждению растворов, обуславливают мелкокристаллическое замерзание растворов;

- обладая небольшой молекулярной массой, они легко проникают в клетки, замещая и связывая воду;

- препятствуют развитию в клетках процессов кристаллизации, обуславливая внутриклеточное мелкокристаллическое замерзание.

Глицерин является осмотически неактивным веществом по отношению к некоторым видам клеток, т.к. из клетки транспортируется с трудом, создавая тем самым, повышенное осмотическое давление. Преимущество ДМСО перед глицерином сводится к быстрому достижению осмотического равновесия через клеточную мембрану. Необходимость отмывания реконсервированных клеток для устранения токсического действия глицерина и ДМСО является общим недостатком этих протекторов.

В отличие от эндоцеллюлярных криопротекторов, экзоцеллюлярные не требуют удаления из клеток после замораживания. Криопротекторное свойство ПВП заключается в том, что он прочно связывает внеклеточную воду и часть воды, извлеченной из клеток, замедляя рост кристаллов льда и, тем самым, обволакивая клетку.

Общие закономерности действия эндоцеллюлярных и экзоцеллюлярных криопротекторов следующие: дегидратация клеток, которые находятся в прямой зависимости от времени контакта и концентрации; вакуолизация цитоплазмы, пикнотизация ядер и другие цитоплазматические эффекты, направленные на снижение адгезидных свойств клеток.

При использовании криопротекторов на выживаемость гамет и эмбрионов влияют:

1. Концентрация криопротектора. Высокая выживаемость гамет и эмбрионов наблюдается после замораживания в среде, которая содержит ДМСО в концентрации от 0,1 до 0,2М, глицерин - от 1,0 до 1,4М. ДМСО и глицерин в концентрациях ниже допустимых норм не проявляют эффективного защитного действия, а в концентрациях выше допустимых норм - оказываются токсичными.

2. Скорость и ее температура, при которой криопротектор вносится в образец, а также время выдержки перед охлаждением.

3. Скорость и температура, при которой криопротектор удаляется после оттаивания.

Криотехника. Для проведения работ по замораживанию, хранению и оттаиванию гамет и эмбрионов необходимо иметь бокс, растворы криопротекторов, стеклянный инвентарь (чашки Петри, пипетки и соломины), аппарат для программного замораживания, сосуд Дьюара с жидким азотом.

Процедура охлаждения сводится к выполнению следующих принципов. Отобранные по качеству гаметы и эмбрионы насыщают криопротектором и помещают в специальные контейнеры соломины - пайеты. Эти пайеты с гаметами и эмбрионами вставляют в устройство программного замораживания с соответствующей программой быстрого или медленного способа.

Пайеты с гаметами и эмбрионами располагают в рабочую камеру, в которой происходит охлаждение за счет подачи хладагента по трубке при нагревании спирали, опущенной в жидкий азот. В комплект входит сосуд Дьюара для жидкого азота. Температура в рабочей камере регистрируется при помощи датчика в электронном блоке замораживателя и сопоставляется с программой. В соответствии с этим изменяется нагрев спирали и подача азота в рабочую камеру. Спираль корректирует температуру в рабочей камере в режиме «отогрев».

Накопление эмбрионов в пробирках или ампулах требует специальных устройств для хранения их в жидком азоте. Один из таких держателей пробирок устроен в виде полного параллелепипеда, опускающегося вертикально в емкость жидкого азота. На одной стенке параллелепипеда высверлены эллипсоидные отверстия для пробирок или пайет. Пробирки опускаются наклонно до упора в противоположную стенку.

Методы замораживания гамет и эмбрионов. В настоящее время в мировой практике используется несколько вариантов, подразумевающих применение криопротекторов, менее длительных процедур охлаждения и быстрого оттаивания. К сожалению, ни в одном случае сравнительный анализ различных модификаций методики замораживания не производился, поэтому мы не можем судить о преимуществах и недостатках той или иной процедуры. Компетентное обсуждение теоретических аспектов замораживания гамет и эмбрионов можно найти в источниках, указанных в рекомендуемой литературе.

В практике при замораживании гамет и эмбрионов используют три метода:

1. Одноэтапный - в этом случае эмбрионы медленно (0,2 - 2°С) охлаждаются в присутствии ДМСО (или другого криопротектора) до температур ниже -70°С. Процесс завершается переходом клеток в твердое состояние.

2. Двухэтапный - гаметы и эмбрионы охлаждают со скоростью 0,3 - 0,5°C/мин до температуры -40°C с дальнейшим погружением образца в жидкий азот. В данном случае полной дегидратации клеток не происходит.

3. Витрификация. При высоких скоростях замораживания (порядка 5000°C/мин) молекула воды не успевает переместиться и образовать кристаллическую решетку. В этом случае вода переходит не в кристаллическое, а амфорное состояние или превращается в стеклообразный лед. Этот физический процесс называется *витрификацией*. При витрификации обеспечивается быстрый и простой способ криозащиты гамет и эмбрионов; отпадает необходимость сидинга гаметной и эмбриональной суспензии и наличие контролируемого периода медленного охлаждения. Следовательно, витрификация обеспечивает быстрый и простой способ криозащиты гамет и эмбрионов. Но при оттаивании, начиная с температуры от -100°C до -25°C (период неустойчивости стекловидного состояния) происходит рекристаллизация, т.е. образование и укрупнение кристаллов. Поэтому необходимо, чтобы нагревание было быстрым.

Таким образом, основными факторами, обуславливающие успех витрификации, являются:

1) состав витрификационного раствора; для витрификации гамет и эмбрионы суспендируют в 90%-ном растворе ВР-I, т.к. концентрация криопротекторов в этом случае менее токсична;

2) процедуры, применяемые для осмотического уравнивания (эквilibрации) гамет и эмбрионов в витрификационном растворе; уравнивание производят при комнатной температуре в 25% -ном растворе ВР-I; а затем в два приема подогревают воздействием повышающихся концентраций витрификационного раствора при 4°C.

Методика работы при замораживании и оттаивании. Образование большого количества льда в гаметам и эмбрионам животных является основным фактором, приводящим их к гибели при замораживании и оттаивании. Причинами их летального исхода служат: 1) механическое повреждение клетки кристаллами льда; 2) осмотический шок в результате образования или таяния льда.

Поэтому успех замораживания зависит от степени обезвоживания клеток, препятствующей формированию внутриклеточного льда.

Жизнеспособность гамет и эмбрионов зависит от эффективности выведения внутриклеточной воды до того, как будет достигнута температура замерзания. Если обезвоживание происходит в процессе охлаждения, скорость охлаждения приобретает критическое значение. Если охлаждение идет слишком быстро, эмбрион не успевает адаптироваться до того момента, когда температура достигнет точки, при которой может произойти инициация кристаллизации, в результате содержимое клетки замерзает с образованием летальных количеств внутриклеточного льда. И напротив, если охлаждение идет слишком медленно, клетки подвергаются действию высоких концентраций внеклеточных растворов слишком долго, в результате изменяется рН и объем клеток уменьшается. В идеальном случае клетки должны охлаждаться

со скоростью, достаточно медленной для того, чтобы они продолжали оставаться в осмотическом равновесии с внеклеточным раствором.

Методы, применяемые для удаления воды из гамет и эмбрионов:

1. При субнулевых температурах: во время образования льда в суспензионной среде концентрация внеклеточных растворов возрастает, давление паров воды внутри клетки становится выше, чем снаружи, и вода устремляется из клетки через мембрану для установления равновесия.

2. Перед охлаждением до субнулевых температур: прибавление раствора сахарозы к суспензионной среде приводит к частичному обезвоживанию бластомеров. Этот способ удаления воды можно сочетать с выдерживанием при относительно высоких субнулевых температурах (обычно около -30°C) (для дальнейшей потери воды) перед быстрым охлаждением до -196°C .

Методика работы при замораживании и оттаивании сводится к выполнению следующих обязательных процедур:

1. Выбор суспензионной среды. Чтобы гаметы и эмбрионы не повредились в результате длительных воздействий неконтролируемых изменений pH среды, забуференной CO_2 , биоматериал следует собирать и замораживать в средах со стабильным pH (от 7,2 до 7,4) в воздухе (простой физиологический раствор, Раствор Дюльбекко, M2).

2. Выбор и подготовка контейнера для образцов. Гаметы и эмбрионы можно замораживать в стеклянных тест-пробирках (диаметром 10 мм, длиной 75 мм), в боросиликоновых стеклянных ампулах (на 1—2 мл) или в пластиковых соломинках (пайетах).

3. Подготовка образца для охлаждения. Данная процедура производится в следующей последовательности: 1) вносят в маркированную ампулу 0,15 мл среды M2; 2) помещают эмбрионы в среду (около 30 на образец); 3) охлаждают образцы до 0°C в ледяной бане до внесения криопротектора.

4. Присутствие криопротекторов в процессе охлаждения. В качестве криопротекторов для криоконсервации гамет и эмбрионов используют обычно ДМСО и глицерин. На выживаемость эмбрионов влияют: а) концентрации криопротектора (ДМСО в концентрации от 1,0 до 2,0 М); б) скорость и температура, при которых криопротектор вносится в образец; в) скорость и температура, при которых криопротектор удаляется после оттаивания.

Методика добавления криопротектора зависит от стадии развития эмбриона и используемого типа криопротектора. Поэтому процедуры, по которым осуществляют добавление ДМСО перед замораживанием, различны. Здесь приводится только одна из них, которая чаще всего применяют при замораживании эмбрионов, находящихся на более поздних стадиях развития:

1) нагревают 3,0М ДМСО до комнатной температуры; 2) вносят пипеткой эмбрионы в ампулу, содержащую 0,15 мл среды M2 при комнатной температуре; 3) добавляют 0,05мл 3,0М ДМСО; 4) тщательно перемешивают; 5) ждут 5 мин; 6) повторяют пункты 3, 4, и 5; 7) повторяют пункты 3 и 4; 8) охлаждают образец до 0°C ; 9) ждут 15 мин, после чего образец переносят в баню для сидинга.

5. Сидинг при температуре ниже точки замерзания среды. В процессе охлаждения со скоростью, не снижающей жизнеспособности эмбриона,

спонтанное замерзание суспензионной среды при достижении точки замерзания (около $-3,5^{\circ}\text{C}$) происходит редко, и образец может переохладиться до -21°C . При образовании льда, которое сопровождается выделением латентного тепла, температура образца поднимается до точки плавления, затем резко падает, пока не установится температурное равновесие с охлаждающей баней. Точная скорость охлаждения зависит от разницы температур образца и охлаждающей бани и может быть порядка $10^{\circ}\text{C}/\text{мин}$. Обезвоживание, необходимое для выживания клетки, происходит только после образования льда в суспензионной среде. Если скорость охлаждения после образования льда слишком высока, количество воды, покидающее клетку в процессе внутриклеточного замораживания, приведет ее к гибели.

Для того чтобы не допустить переохладения, в образце индуцируют образование льда (сидинг) при температурах, следующих сразу ниже точки замерзания суспензионной среды. Для сидинга можно использовать любую баню, в которой может поддерживаться температура -5°C или -6°C дольше 15 мин.

6. Медленное охлаждение ($-0,5^{\circ}\text{C}/\text{мин}$), заканчивающееся при -40°C или (ниже -70°C) в результате погружения в жидкий азот (ЖА).

Для оптимальной выживаемости эмбрионы млекопитающих требуют относительно низких, по сравнению с другими клетками, скоростей охлаждения ($0,2-2,0^{\circ}\text{C}/\text{мин}$). На практике эмбрионы в 1,5М ДМСО охлаждают со скоростью $0,3-0,5^{\circ}\text{C}/\text{мин}$. Скорость охлаждения измеряется в пределах от -10 до -60°C . Медленное охлаждение заканчивают при -40°C или при температурах -70°C погружением образца в ЖА.

После сидинга образец следует подвергнуть следующим процедурам: 1) ампулу опускают в охлаждающую баню так, чтобы содержимое было ниже уровня охладителя; 2) сосуд Дьюара, содержащий ЖА, дает скорость охлаждения $0,3-0,5^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ благодаря программному обеспечению; 3) при достижении образца температуры -40°C (или -70°C) ампула извлекается из охлаждающей бани и погружается в контейнер с ЖА.

7. Хранение при -196°C в ЖА. При -196°C могут происходить только фотофизические реакции, т. е. ионизация вследствие радиации. При отсутствии процессов ферментативной репарации в период длительного хранения в эмбрионах могут накапливаться летальные количества повреждений. Однако до сих пор не получено каких-либо аргументов в пользу этого предположения. Нормальные фертильные животные развились из предимплантационных эмбрионов, хранившихся в ЖА до 15 лет.

При создании банка гамет и эмбрионов важным условием является правильная и полная регистрация данных о хранящемся материале. Минимально необходимая информация включает следующие данные: дата криоконсервации, характеристика сохраняемой линии животных, номер ампулы (пайеты), число ооцитов/эмбрионов на ампулу (пайету), стадия развития, метод консервации, местонахождение в хранилище ЖА, необходимый способ размораживания и процедура разбавления.

До сих пор не получено данных, свидетельствующих о том, что животные, происходящие из замороженных эмбрионов, оказались генотипически

или фенотипически измененными в результате процессов замораживания и оттаивания. Нужно учитывать, что фенотип может быть модифицирован внутриматочным окружением, вследствие чего эмбрионы, развивающиеся в самках-реципиентах, могут отличаться от эмбрионов, полученных от естественной биологической матери. Но это не отражается на генетической характеристике получаемого "криоконсервированного" трансплантата.

8. Размораживание. Температура, при которой заканчивается медленное охлаждение, определяет скорость нагрева, необходимую для оптимального выживания эмбрионов. Так, если медленное охлаждение заканчивается при относительно высоких субнулевых температурах (-40°C), эмбрионы содержат некоторое количество внутриклеточной воды, которая витрифицируется при быстром охлаждении до -196°C . Чтобы избежать девитрификации и роста летальных количеств внутриклеточного льда, необходим быстрый нагрев. И наоборот, эмбрионы, медленно охлаждаемые до температур ниже -70°C , нуждаются в медленном, а не быстром нагреве. Для большинства клеток млекопитающих оптимальная выживаемость достигается в результате быстрого нагрева и не зависит от режима охлаждения.

Методы размораживания эмбрионов при медленном охлаждении ($0,3-0,5^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ в $1,5\text{ M ДМСО}$):

1) если медленное охлаждение заканчивалось при -40°C , то образец нагревают со скоростью $50^{\circ}\text{C}/\text{мин}$, опустив его в воду при 40°C (помешивая воду ампулой);

2) если медленное охлаждение продолжалось ниже -70°C , то образец медленно нагревают со скоростью от 4 до $20^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ при подвешивании ее на воздухе при комнатной температуре (нагрев будет происходить со скоростью около $10^{\circ}\text{C}/\text{мин}$).

Независимо от скорости нагрева, после того как исчезнут остатки льда, необходимо до удаления ДМСО образец продержать при комнатной температуре в течение 5 мин.

9. Осторожное удаление криопротектора после оттаивания для предотвращения осмотического шока.

Для того чтобы избежать повреждения от осмотического шока необходимо после размораживания клеток удалить криопротектор. Адаптация эмбрионов при возвращении в нормальные физиологические условия (т.е. из среды с осмолярностью в $1,5\text{ мОсмоль}$ в питательную среду с осмолярностью около $0,3\text{ мОсмоль}$) зависит от: 1) количества криопротектора, проникшего в бластомеры перед охлаждением; 2) их относительной проницаемости для воды и протекторного соединения; 3) температуры.

Вода обычно проникает легче, чем криопротектор, поэтому в результате разбавления суспензии транспорт воды в клетку будет превалировать над транспортом криопротектора из клетки и бластомеры разбухнут. Контроль степени разбухания принято осуществлять путем поэтапного удаления криопротектора из гамет и эмбрионов при 0°C или 20°C .

Процедура двухступенчатого удаления $1,5\text{ M ДМСО}$ при комнатной температуре из гамет и эмбрионов после оттаивания заключается в следующем:

1) после таяния льда в образце, делают царапину на шейке ампулы и отламывают верхушку; 2) через 5 мин., когда образец приобретает комнатную температуру, к образцу объемом 0,3 мл добавляют 1 мл М2; 3) перемешивают и спустя 1 мин с помощью пластиковой пипетки на 1 мл, переносят содержимое ампулы в эмбриологическое часовое стекло; 4) сполоснув ампулу дважды средой М2 (для каждого споласкивания используют 1 мл среды) ее переносят в часовое стекло; 5) эмбрионы переносят в хорошо оттянутую пастеровскую пипетку и отмывают дважды М2 (по 2 мл на отмывку).

После удаления ДМСО гаметы после оценки их качества используются для оплодотворения *in vitro* или *in vivo*, а эмбрионы – для культивирования или трансплантации.

10. Оценка жизнеспособности консервированного материала. Число сохраняемых гамет и эмбрионов, представляющих каждую породу животных, зависит от потребностей лаборатории. Чтобы точно определить, сколько гамет и эмбрионов необходимо для консервации, нужно оценить выживаемость каждой законсервированной партии.

Жизнеспособность заморожено-оттаянных эмбрионов оценивается по развитию из них живых животных. Поэтому перед пересадкой реципиенту необходимо оттаявшие эмбрионы оценить после культивирования *in vitro* морфологически. При культивировании у заморожено - оттаянных эмбрионов наблюдаются замедленные темпы развития. Так, было установлено, что при культивировании заморожено-оттаянных эмбрионов *in vitro* темп дробления отстает от биологически запрограммированных стандартов на 10 – 20% у коров и на 15 – 20% у овец и свиней. Следовательно, культивирование *in vitro* способствует регуляции метаболизма перед переносом эмбрионов в репродуктивный аппарат реципиентов и повышает, таким образом, долю нормально развивающихся плодов.

Поэтому после удаления ДМСО необходимо просмотреть эмбрионы в препаровальном микроскопе и классифицировать их в соответствии со следующими критериями: 1) нормальные (внешний вид такой же, как у не замораживавшихся эмбрионов соответствующей стадии развития); 2) бластомеры разбухли; 3) один или более бластомеров подверглись лизису; 4) дегенерировали; 5) ZP утрачена или разорвана.

Вероятность того, что нормальные эмбрионы возобновят развитие в культуре, высока. Разбухание бластомеров свидетельствует о том, что в клетках осталось некоторое количество ДМСО, или транспорт через мембрану нарушен. Разбухшие эмбрионы могут «оправиться», но некоторые (до 40%) лизируют. Способность поврежденных эмбрионов продолжить нормальное развитие зависит от стадии, на которой они были заморожены, и от числа поврежденных бластомеров. Потеря одного бластомера на 2 - клеточной стадии обычно оказывается летальной, и лишь немногие из поврежденных 4 - клеточных эмбрионов способны сформировать нормальную бластоцисту. Восемью клеточные эмбрионы после утраты одного или двух бластомеров сформируют бластоцисту с уменьшенным числом клеток внутренней клеточной массы и смогут развиваться дальше после переноса. Эмбрионы ранних стадий развития (меньше 8 клеток) плохо развиваются в культуре без зоны пеллюцида, их не

следует переносить в яйцевод, пока не пройдет стадия компактизации. Эмбрионы поздних стадий развиваются нормально без оболочки так же, как и эмбрионы всех стадий, оставшиеся внутри разорванной оболочки. Однако в отсутствие интактной зоны пеллюцида возрастает риск вирусной инфекции.

11. Трансплантация эмбрионов. Для того чтобы развитие эмбрионов завершилось рождением живых детенышей, эмбрионы предимплантационных стадий должны быть перенесены в организм приемной матери. Перенос осуществляют с помощью хирургических методов (в яйцевод или матку) и нехирургической процедуры. При пересадке учитывают число трансплантируемых эмбрионов. Обычно переносится от двух до трех эмбрионов для одноплодных животных и от трех до шести эмбрионов в каждый яйцевод или рог матки (т.е. общее число эмбрионов составляет 6–12 на реципиент) – для многоплодных. Если использовать меньшее их число, беременность может не установиться, кроме того, у очень маленького приплода меньше шансов выжить. Перенос слишком большого числа эмбрионов приведет к замедлению их роста.

Таким образом, факторы, влияющие на выживание при замораживании и оттаивании, взаимозависимы, и изменение одного из них создает необходимость изменения остальных для того, чтобы выживаемость осталась на прежнем уровне.

Резюме

Как Вы убедились методы хранения гамет и эмбрионов в жидком азоте чрезвычайно важны для развития животноводства, биологии и медицины. Основное предназначение данной методики сводится, прежде всего, к сохранению генофонда как сельскохозяйственных, так и диких животных. Поэтому при наличии банка гамет и эмбрионов происходит:

1. Гуманное распространение ценных генотипов животных в международном масштабе.
2. Решение проблем, связанных с бесплодием.
3. Сохранение генофонда ценных и исчезающих видов животных.

Ключевые слова и понятия:

Витрификация
Глицерин
Девитрификация
ДМСО
Замораживание
Криобиология
Криозащита

Криоконсервация
Криопротектор
Криотехника
Методы замораживания
Методы оттаивания
Оттаивание
Техника замораживания

Контрольные вопросы:

1. Охарактеризовать температурные зоны при воздействии на биологический объект низких температур.
2. Раскрыть двухфакторную теорию повреждения биологической системы при действии на них высоких температур.

3. Охарактеризовать повреждения гамет и эмбрионов при воздействии на них низких температур.

4. Раскрыть преимущества использования метода криоконсервации в животноводстве, биологии и медицины.

5. Дать разъяснение процедурам, связанных с криоконсервацией гамет и эмбрионов. Изучить особенности применяемых методов по замораживанию и оттаиванию гамет и эмбрионов.

6. Дать техническую характеристику оборудованию и приборам, используемых при криоконсервации гамет и эмбрионов.

7. Какие факторы влияют на успех в криоконсервации гамет и эмбрионов? Для каких целей применяют криопротекторы, и какую роль они выполняют?

Рекомендуемая литература. Более подробно вопросы по криоконсервации рассматриваются в учебниках А.Д.Курбатова, 1988 (Криоконсервация спермы сельскохозяйственных животных) и А.М.Белоуса, 1986 (Криоконсервация репродуктивных клеток). Кроме того, необходимо отметить работы наших отечественных ученых, которые занимаются исследованиями в области криоконсервации гамет и эмбрионов. Для изучения данного вопроса с научной точки зрения рекомендую обратиться к работам сотрудников лаборатории по биотехнологии воспроизводства и искусственному осеменению (профессор Касымов Т.К., ВНС, к.с.-х.н. Аuezбаев С.А., Малмаков Н.И. и др.; 1982-2003гг) НПЦ «Ветеринарии и животноводства».

Компетентную и полную информация по вопросам криобиологии и криоконсервации заинтересованный студент может также найти в следующих зарубежных источниках:

1. Wilmut I. (1986). Manipulation of Mammalian Development. Gwatkin R. B. L. (ed.), Plenum Press, New York.

2. Rail W. F., Reid D. S., Polge C. (1984) Cryobiology, 21, 106.

3. Fahy G. M., MacFarlane D. R., Angell C. A., Meryman H. T. (1984). Cryobiology, 21, 407.

4. Whittingham D. G. (1977). In: The Freezing of Mammalian Embryos. Effie Foundation Symposium 52, Elliott K. and Whelan J. (eds), Elsevier/North Holland, Amsterdam, p. 97.

5. Scheffen B., Van Der Zwalm P., Massip A. (1986). Cryo-Letters, 7, 260.

6. Rail W. F. (1986). Cryobiology, 23, 548.

7. Leibo S. P., Mazur P. (1978). In: Methods In Mammalian Reproduction. Daniel J. C., Jr (ed.), Academic Press, New York, p. 179.

8. Whittingham D. G. (1980). In: Low Temperature Preservation in Medicine and Biology Ashwood-Smith M. J., Farrant J. (eds), Pitman Medical, Tun-bridge Wells, UK p. 65.

9. Quinh P., Bands C., Whittingham D. G. (1982). J. Reprod. Fert., 66, 161.

10. Fuller B. L., Bernard A. (1984). Cryo-Letters, 5, 307.

ЧАСТЬ IV. ЭМБРИОИНЖЕНЕРИЯ



Эмбриоинженерия – это наука, занимающаяся изменением генетической программы животных на уровне их гамет и эмбрионов. В круг ее интересов входят молекулярная и клеточная биотехнология и биотехнология воспроизводства.

Молекулярная биотехнология использует ДНК от различных организмов с целью получения рекомбинантных молекул. Клеточная биотехнология применяет различные микроманипуляции с целью получения клонированных и трансгенных эмбрионов и создания им благоприятных условий для “реанимации”. А благодаря методам биотехнологии воспроизводства для эмбрионов после микрохирургии создается идеальная естественная инкубационная среда с целью их биологической реализации в новые “сконструированные” индивидуумы.

Основная цель эмбриоинженерии сводится к осуществлению контролируемых биологических манипуляций, связанных с генами и клетками для создания ценных генетических программ.

Глава 13. Основы молекулярной биологии

Цель: Изучить молекулярную структуру ДНК и механизмы репликации, транскрипции и трансляции.

После изучения главы студент сможет:

- дать определение терминам “нуклеотид”, “репликон”, “реплисома”, “репликация”, “транскрипция”, “трансляция”;
- иметь общее представление о репликационном механизме клеток эукариот;
- охарактеризовать различия в строении структурных генов прокариот и эукариот;
- раскрыть особенности работы транскрипционной единицы эукариот и прокариот;
- раскрыть биологическую сущность синтеза белка.

* * *

Для понимания принципов “конструирования” рекомбинантных ДНК и экспрессии клонируемого гена необходимо знать молекулярную структуру нуклеиновых кислот и понимать механизмы репликации, транскрипции и трансляции.

13.1. Структура ДНК по Д. Уотсону и Ф. Крику

В 1953 г Джеймс Уотсон и Френсис Крик используя рентгенограмму ДНК, которая была получена в лаборатории М. Уилкинса Р. Франклином и Р. Госмингом, предложили модель структуры ДНК. Основываясь непосредственно на рентгенограмме Дж. Уотсон и Ф. Крик пришли к следующим выводам (с дополнениями):

1. Дезоксирибонуклеотид - структурная единица молекулы ДНК, состоящая из трех компонентов: пятиатомный углерод дезоксирибоза; пуриновое (А, Г) или пиримидиновое (С, Т) азотистое основание и фосфорная группа. Эти компоненты соединены между собой ковалентными связями.

При этом азотистые основания соединяются с первым атомом углерода дезоксирибозы, образуя дезоксирибонуклеозиды, которые посредством фосфодиэфирных связей между 5'-атомом углерода одной дезоксирибозы и 3'-атомом углерода другой соединяются в полимерную цепочку (рис. 13.1, табл. 13.1.).

Интактная молекула ДНК содержит, в зависимости от видовой принадлежности организма, от нескольких тысяч до многих миллионов нуклеотидов.

2. Соединение дезоксирибозы с фосфорной группой образует «сахарофосфатный остов». Их в молекуле ДНК два. Между этими остовами располагаются азотистые основания.

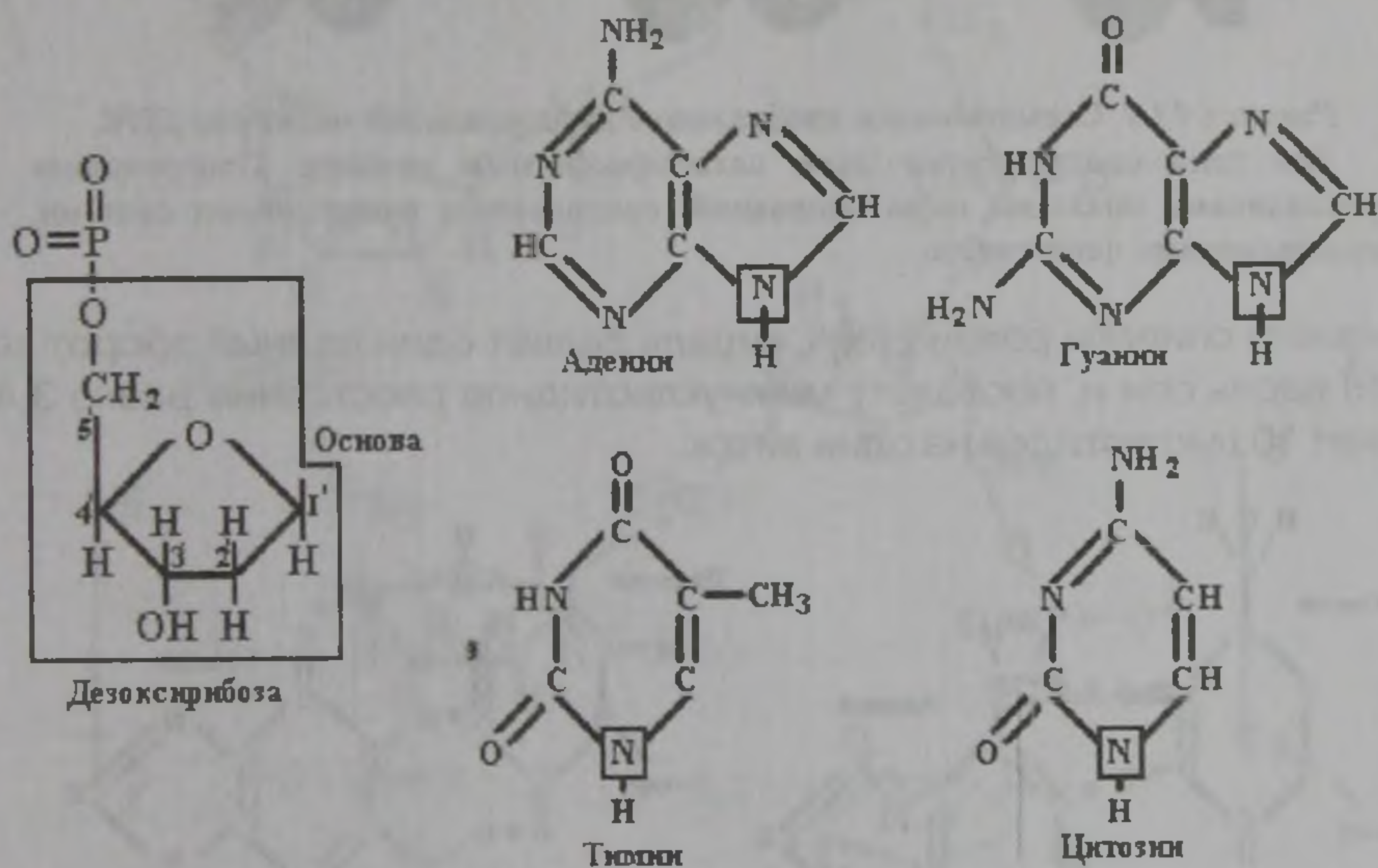


Рисунок 13.1. Химическая структура компонентов ДНК.

Дезоксирибонуклеотид - структурная единица ДНК. Термин «основа» подразумевает соединение азотистого основания. Азотистые основания: пуриновые - аденин, гуанин; пиримидиновые - тимин, цитозин.

ДНК - это двухцепочечный правильной формы спиралеобразный полимер (рис. 13.2.), цепи которых закручены одна вокруг другой и вокруг общей оси. Цепи ДНК антипараллельны.

Таблица 13.1. Азотистые основания ДНК		
Наименование (на языке)		Международная символика
русском	английском	
аденин	adenine	A
гуанин	guanine	G
тимин	thymine	T
цитозин	cytosine	C

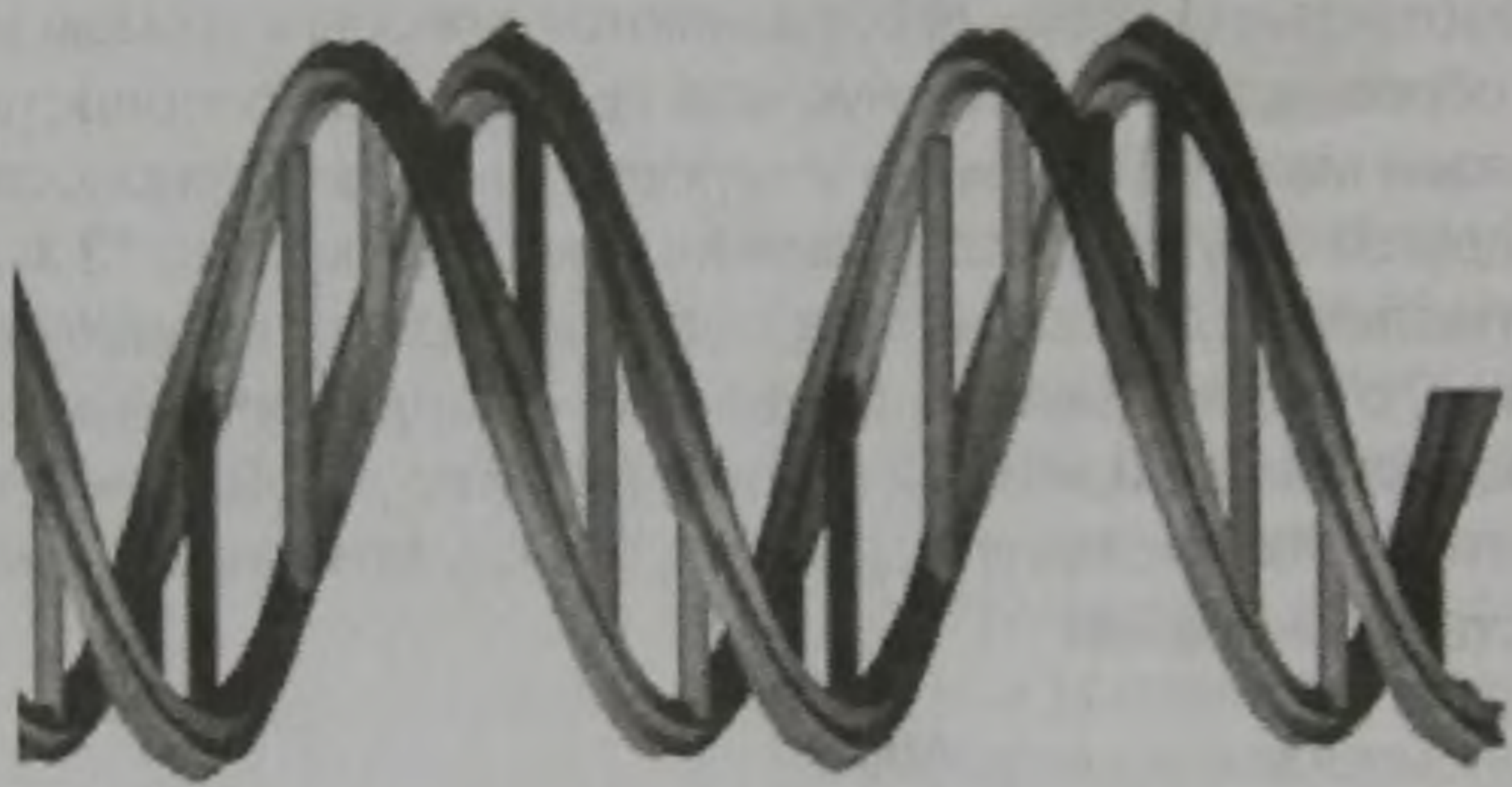


Рисунок 13.2. Схематическое изображение двуспиральной молекулы ДНК.

Две цепи соответствуют двум сахарофосфатным остовам. Поперечными перекладинами показаны пары оснований, соединенные водородными связями, удерживающими цепи вместе.

Диаметр спирали равен 20 \AA . Спираль делает один полный оборот каждые 34 \AA вдоль оси и, поскольку межнуклеотидное расстояние равно $3,4 \text{ \AA}$, содержит 10 нуклеотидов на один виток.

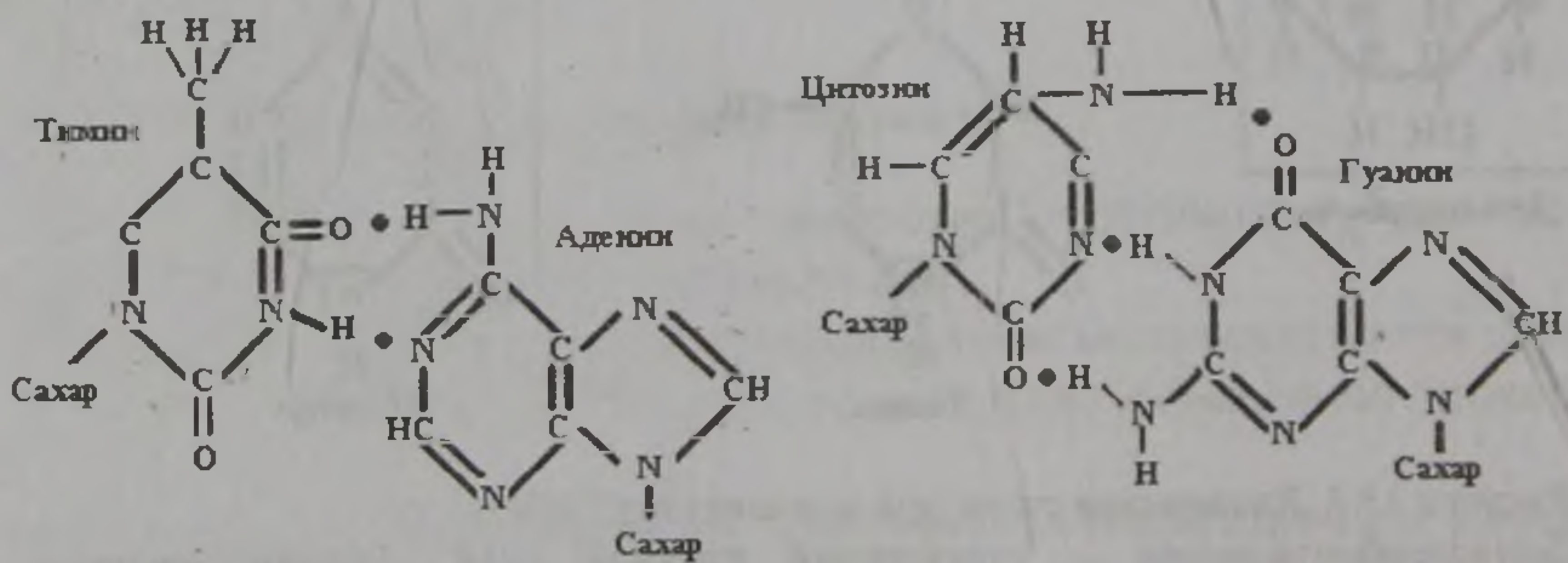


Рисунок 13.3. Спаривание аденина с тимином и гуанина с цитозином в двуспиральной молекуле ДНК. Водородные связи изображены точками.

3. Состав дезоксирибонуклеотидов в ДНК подчиняется правилам Чаргаффа (комплементарность), согласно которому количество пуринов (A,G) равно количеству пиримидинов (T,C) и, наоборот.

Сцепление между двумя цепями в молекуле ДНК обеспечивается особыми водородными связями: между аденином и тимином – двойная, а между гуанином и цитозином – тройная водородная связь (рис. 13.3; 13.4.).

Число комплементарных пар оснований (нуклеотидная пара ® н.п.) используют для того, чтобы охарактеризовать длину двухцепочечной спирали ДНК. Для ДНК с тысячами или миллионами пар оснований длина соответствует 1 килооснованию (kilo base ® kb) или 1 мегаоснованию (1 mega base ® Mb). Например, длина ДНК первой хромосомы человека составляет примерно 263 Mb (1 Mb = 1 000 000 н.п.).

Строгий порядок дезоксирибонуклеотидов определяет информационное содержание индивидуального генетического элемента, названного *геном*.

Благодаря генетическому материалу в живой материи осуществляются два главных для жизни процесса. Первый сводится к воспроизведению с высокой степенью точности (репликация), второй – к кодированию информации для производства белков. Модель структуры ДНК по Уотсону и Крику полностью выполняет эти важные требования для клетки и организма, в целом.

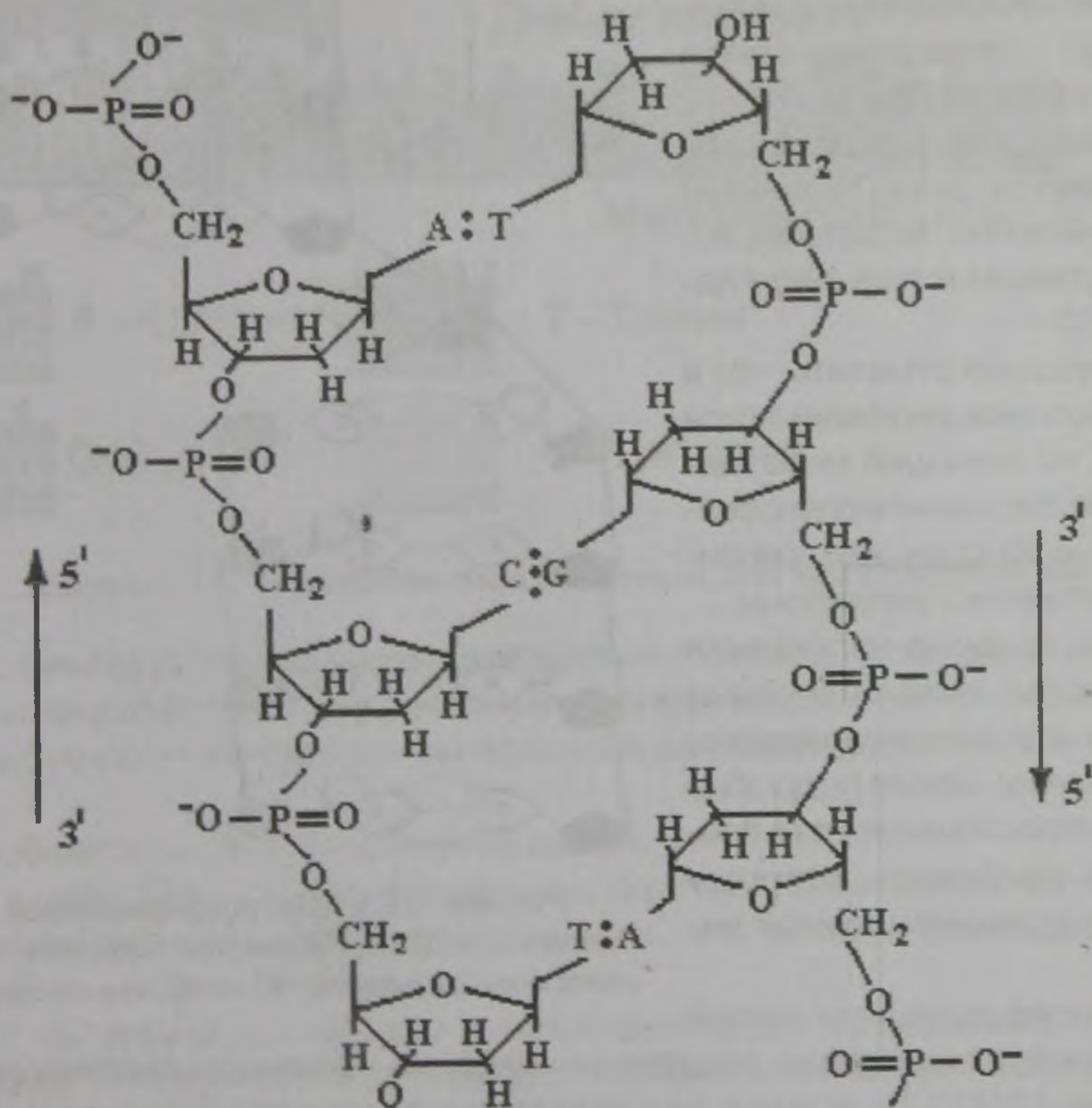


Рисунок 13.4. Химическая структура двухцепочечной молекулы ДНК.

Сахарофосфатный остов расположен снаружи и заряжен отрицательно; азотистые основания расположены внутри. Закручивание двух цепей в спираль не показано.

13.2. Репликация ДНК

Синтез ДНК – это сложный биологический механизм. По Уотсону и Крику каждая из двух цепей ДНК служит шаблоном для производства новой цепи. Последовательность синтезируемых нуклеотидов определяется взаимозависимостью между основаниями (правило Чаргаффа). Продуктами репликации являются две дочерние двухцепочечные молекулы ДНК, каждая из которых состоит из исходной и вновь синтезированной цепи. Такой способ репликации относят к *полуконсервативному* (рис. 13.5; 13.6.).

По имеющимся сведениям можно представить упрощенную модель репликационной системы клеток:

1. Расплетание двойной спирали, что возможно при участии трех основных типов белков: *топоизомеразы* (удаляют супервитки спирали), *хеликазы* (раскручивают и расплетают двойную спираль ДНК) и *SSB* – *белка* (связывается с одноцепочечной ДНК).

В целом, эта процедура сопровождается значительными энергетическими затратами, которая покрывается за счет гидролиза АТФ.

Необходимо отметить, что в процесс репликации вовлекаются продукты, по меньшей мере, десятки генов. Весь же комплекс белков, которые обеспечивают репликацию, составляют реплисому.

Здесь, с целью упрощения раскрываются только основные процессы (процессы упрощены до максимума). Более подробно данный вопрос излагается в специальных учебниках, которые отражены в рекомендуемой литературе.

2. Синтез дочерних цепей ДНК, который происходит на разделенном участке, названном *репликационной вилкой* (рис. 13.6; 13.7.). Условно этот этап можно разделить на три периода:

2.1. Синтез праймеров (РНК-затравки). Праймеры – это короткие РНК-содержащие фрагменты в молекуле ДНК, необходимые для инициации репликации. Праймеры обладают следующими особенностями:

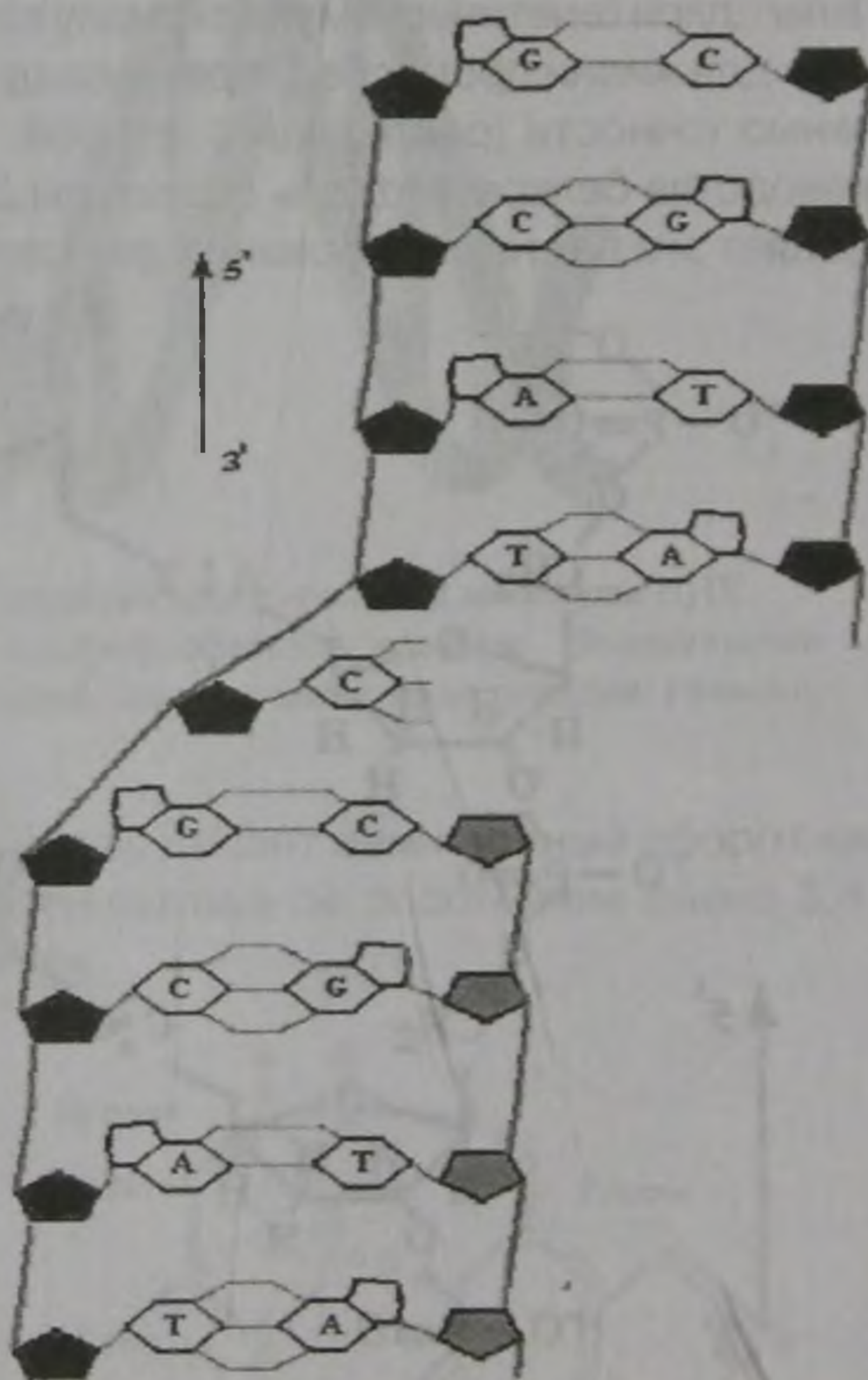


Рисунок 13.5. Полуконсервативный тип репликации ДНК. На рисунке показана схема синтеза на “лидирующей” цепи.

- для его синтеза необходимо функционирование фермента праймазы, которая действует в комплексе с SSB – белком;

- находятся на 5'-конце и имеют очень короткую последовательность (не более 10-14 нуклеотидов);

функционально не продолжительны, поэтому в структуре зрелой ДНК они не сохраняются (праймеры удаляются ферментом 5'-3'-экзонуклеаза), а образовавшаяся при удалении праймера брешь восполняется ферментом ДНК-полимераза I.

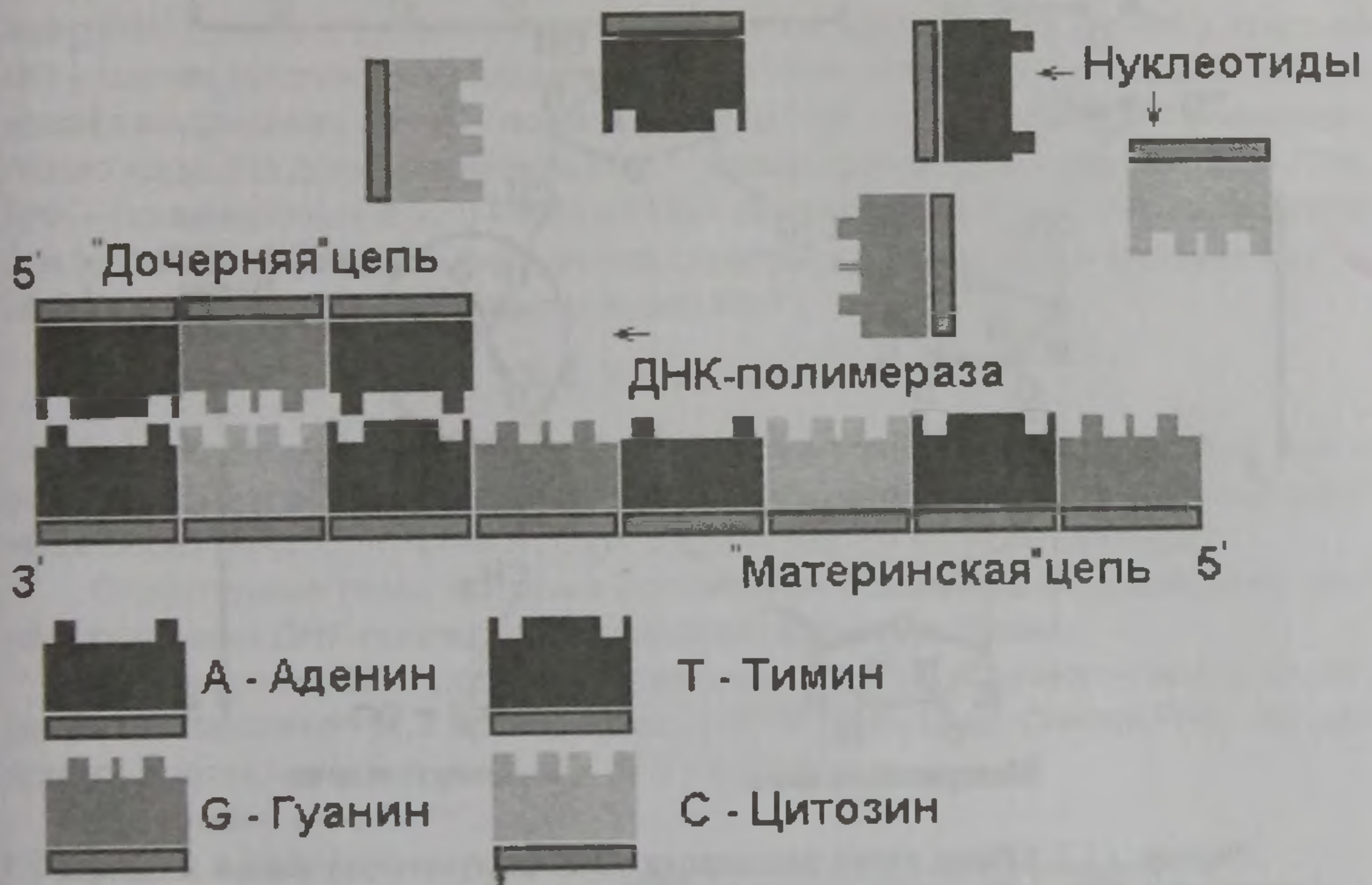


Рисунок 13.6. Упрощенная схема репликации ДНК на лидирующей цепи.

2.2. Синтез дочерних цепей ДНК. ДНК-полимераза III связывается с праймером и начинается синтез дочерней цепи вдоль ДНК от ее стартовой точки. Доминирующую позицию в этом процессе занимает фермент ДНК-полимераза I.

Особенность синтеза дочерних цепей:

а) цепи ДНК – антипараллельны, поэтому на репликационной вилке различают "лидирующую" (в направлении 3' → 5'-конец) и "запаздывающую" (в направлении 5' → 3'-конец) цепи;

б) на "лидирующей" цепи синтез происходит непрерывно, на "запаздывающей" – прерывисто (фрагменты Оказаки), длина фрагментов не превышает 1000-2000 нуклеотидов.

3. Образование фосфодиэфирных связей между фрагментами ДНК с целью формирования единой молекулы. Этот механизм обеспечивается ферментом ДНК-лигаза.

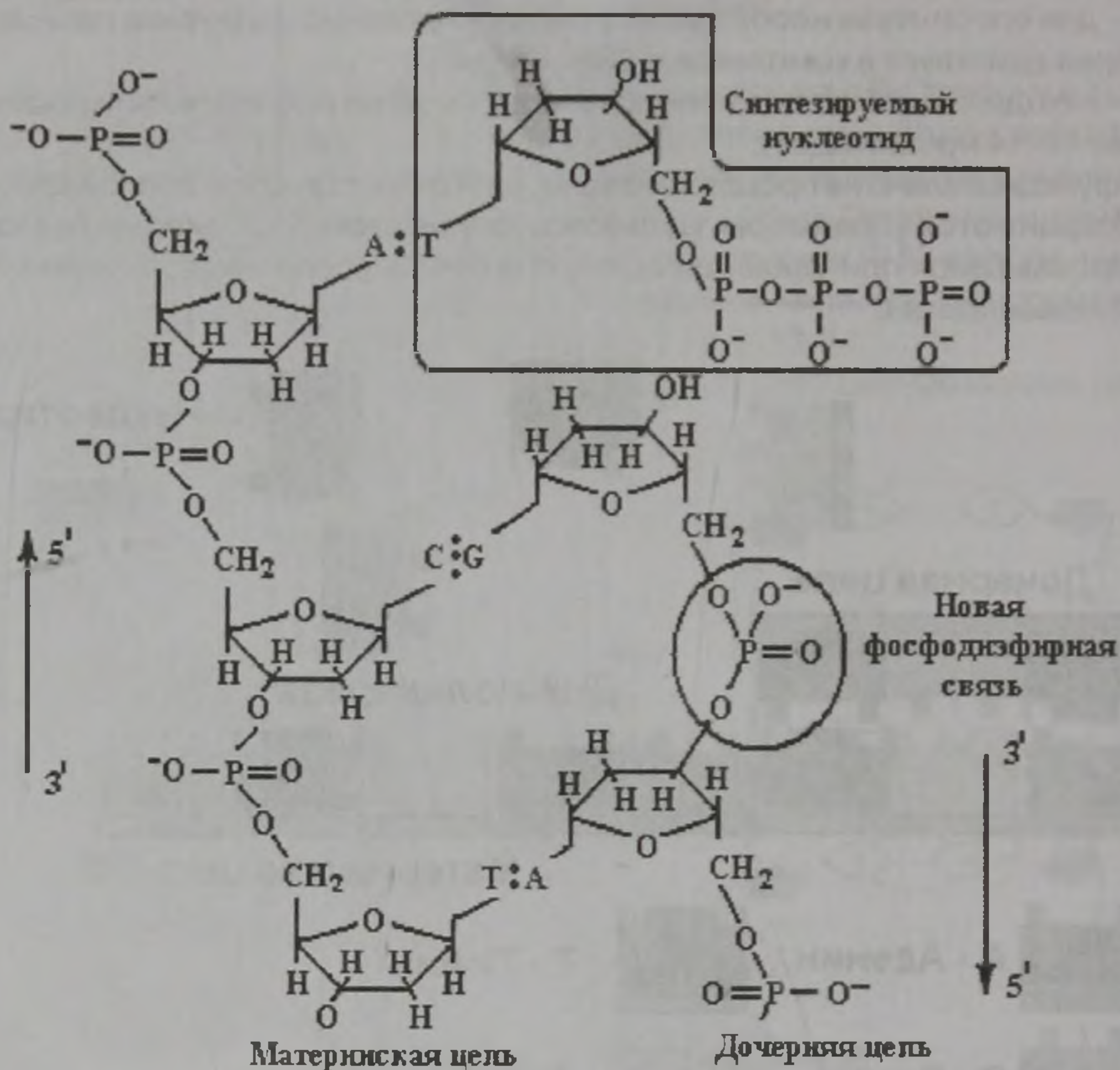


Рисунок 13.7. Общая схема репликации ДНК (полуконсервативный механизм репликации). Схема образования новой фосфодиэфирной связи и синтеза нуклеотида.

Инициация репликации ДНК неизбежно влечет за собой дальнейшее деление клетки. Следовательно, репликация ДНК играет важную роль в передаче генетической информации, записанной в последовательности азотистых оснований от родительской к дочерним молекулам ДНК, от родительской к дочерним соматическим клеткам и от родительского организма – потомкам.

13.3. РАСШИФРОВКА ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ИНФОРМАЦИИ

Расшифровка генетической информации производится через рибонуклеиновую кислоту (РНК), которая представлена линейной полинуклеотидной цепью. РНК отличается от ДНК по трем важным аспектам:

- а) моносахарид представлен рибозой, который имеет гидроксильные группы на 2'- и 3'-атоме углеродного моносахарида;
- б) вместо тимина в РНК содержится урацил (U);
- с) по сравнению с ДНК, РНК состоит из одной цепи.

Различают три типа РНК, которые необходимы для расшифровки генетической информации – транспортная РНК, (тРНК), рибосомальная РНК (рРНК), матричная РНК (мРНК). В метаболически активных клетках на долю мРНК приходится примерно 3-5%, рРНК – 90% и тРНК до 4% от всех клеточных РНК.

Для большинства клеток прокариот за транскрипцию всех типов РНК ответственна одна РНК – полимеразы. А в клетках эукариот каждый вид РНК (матричная, транспортная и рибосомальная) расшифровывается различными РНК – полимеразы.

РНК – полимеразы первой группы (I) ответственна за транскрипцию генов рРНК, второй (II) – за синтез гетерогенной ядерной РНК (гяРНК), третьей (III) – синтез многих малых ядерных РНК и тРНК. РНК – полимеразы I локализована в ядрышках, а РНК – полимеразы II и РНК – полимеразы III – в нуклеоплазме ядра. На долю фермента РНК – полимеразы I приходится – 50 - 70%, РНК – полимеразы – II – 20 - 40% и РНК – полимеразы III – до 10% клеточного синтеза РНК. Активация ферментов I группы стимулируется ионами Mn^{2+} и Mg^{2+} , а II и III-ей групп – только ионами Mn^{2+} .

13.4. Транскрипция

Транскрипция – это синтез РНК на молекуле ДНК. Участок ДНК, с которой считывается РНК, называется *транскрипционной единицей*. Данная единица берет начало от промотора и заканчивается на терминаторе.

Структурные гены, которые составляют обширное большинство расшифрованных ДНК последовательностей, кодируют белки.

Функциональным продуктом транскрипции структурного гена в прокариотах является мРНК, а в эукариотах – гяРНК (рис. 13.8). Синтез РНК – транскрипта протекает в направлении от 5' - к 3' - концу.

Как видно из рисунка 13.7, в ДНК эукариот различают экзоны, длина которых варьирует от 150 до 200 оснований, и интроны, их длина варьирует от 40 и более чем до 10000 оснований. Для формирования функциональной мРНК необходимы экзоны.

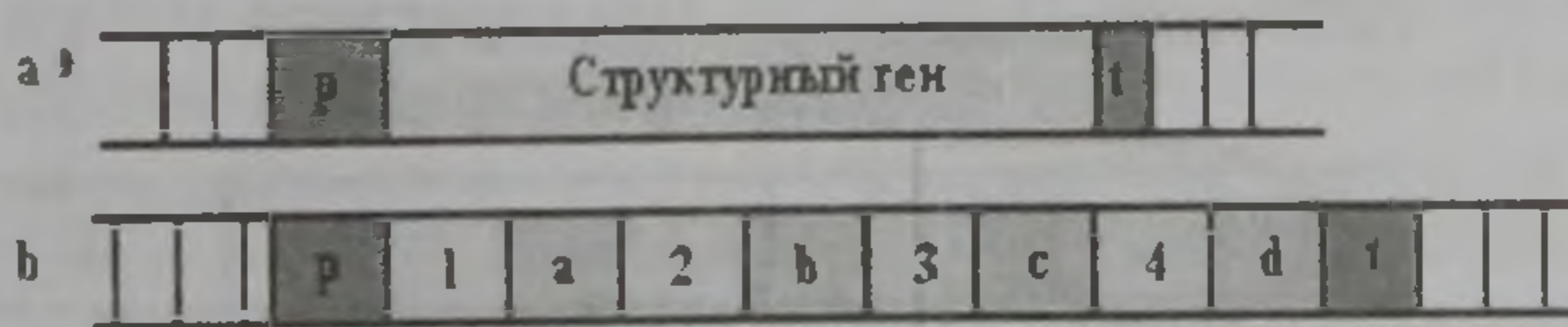


Рисунок 13.8. Схема структурного гена прокариот (а) и эукариот (б).

Транскрипционная единица бактерий. Бактериальная клетка не может себя обеспечить энергетическим ресурсом для поддержания транскрипции и трансляции всех структурных генов в одно и тоже время. Поэтому гены, которые кодируют белки основных клеточных функций “обслуживаются” непрерывно. Транскрипция других генов регулируется.

Часто, бактериальные структурные гены, которые кодируют белки для одной “метаболической магистрали” смежны. Такая “договоренность” называется опероном. Оперон находится под контролем одного промотора, и та-

кая транскрипция выдает одну большую мРНК. Размещение стоп кодона (терминатора) для одного протеина закрывается на первом кодоне следующего протеина. Поэтому в пределах мультигена мРНК производит набор информации для дискретных белков в течение одной транскрипции.

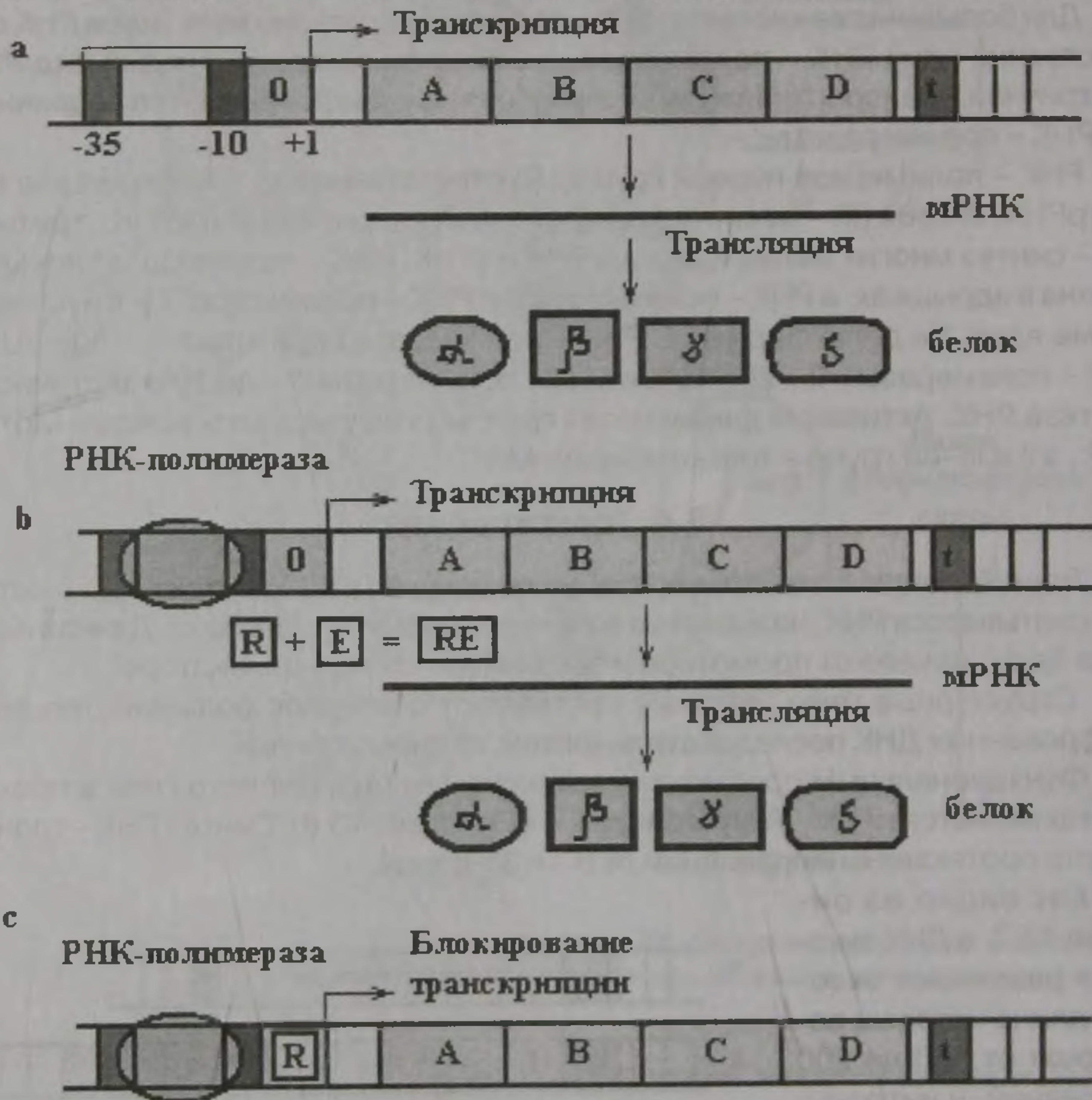


Рисунок 13.8. Транскрипционная единица бактерий.

а) схема строения: А, В, С, D, E – структурные гены оперона. Структурные гены (А, В, С, D, E) оперона (O) находятся под контролем оператора (o) и промотора (p). РНК-полимераза связывается с участками, которые расположены на расстоянии -10 и -35 н.п. от сайта иницирования транскрипции (+1). Синтез прекращается на терминаторе (t). При трансляции происходит синтез белков (α, β, γ, δ);

б) схема инициации транскрипции: белок-репрессор (R) образует соединение с белком эффектором (E) и оператор ведет себя как инициатор, так как репрессор-эффекторный комплекс (RE) не может соединиться с оператором и РНК-полимераза перемещается вдоль ДНК для осуществления транскрипции;

с) схема блокирования транскрипции: соединение белка репрессора с оператором приводит к тому, что РНК-полимераза не может перемещаться вдоль ДНК и транскрипция блокируется. В этом случае оператор ведет себя как терминатор.

Рассмотрим работу оперона на примере *E. Coli*. Для большинства структурных генов *E. Coli* промотор содержит два участка, которые специфичны для РНК – полимеразы (рис. 13.9.). Один из этих участков имеет следующую последовательность (ТАТА – бокс или бокс Прибнова): ТАТААТ другая: TTGAC АТАТТА ААСТG.

Множество сложных регулирующих систем управляют опероном так, что он либо является “инициатором”, либо – “терминатором”. Например, когда регуляторный белок, “дает о себе знать” репрессор (repressor – R) связывается с оператором и РНК-полимераза не может перемещаться вдоль ДНК и, следовательно, транскрипция блокируется.

Однако, низкомолекулярный исполнительный элемент эффектор (effector – E) может связаться с репрессорным белком и “заменить” его устройство таким образом, что этот участок будет себя вести как “инициатор” транскрипции. Как правило, эффектор разрушается клеточной деятельностью. Когда уровень концентрации молекул эффектора уменьшается, вновь синтезированная белковая молекула репрессор связывается с оператором и синтез восстанавливается. Каждый оператор специфичен для оперона.

Как видно из рисунка 13.8. ТАТА – бокс и TTGAC – последовательности расположены от начала инициации (+1 нуклеотид) приблизительно на расстоянии –10 н.п. и –35 н.п. Последовательность, которая находится между ТАТА – боксом и +1 нуклеотидной парой играет существенную роль в “расшифровке” оперона. В зависимости от способа регулирования транскрипции оперона, это область называется либо оператором, либо активирующим сайтом. Поэтому различают отрицательно управляемую систему и положительно управляемую систему.

“Отрицательно управляемая система” регулирует транскрипцию путем репрессора (ри. 13.8.), а “положительно управляемая система” – путем активатора (Act), последняя действует как «смазка колес» для транскрипции. В некоторых случаях, молекула спецификатора преобразовывает активный активатор в неактивный и уменьшает показатель транскрипции оперона, а в других случаях, молекула спецификатора активизирует неактивный активатор. Третий тип регуляции транскрипции для клеток бактерий рассматривается в главе 14.7.

Транскрипционная единица эукариот. Для большинства клеток эукариот имеется общий набор структурных генов, которые поддерживают обычные клеточные функции. В одних клетках, определенные структурные гены расшифровываются для того, чтобы придать ткани или органу исключительные свойства, в других - структурные гены активизируются каскадом событий, которые приводят к определенным экстра клеточ-

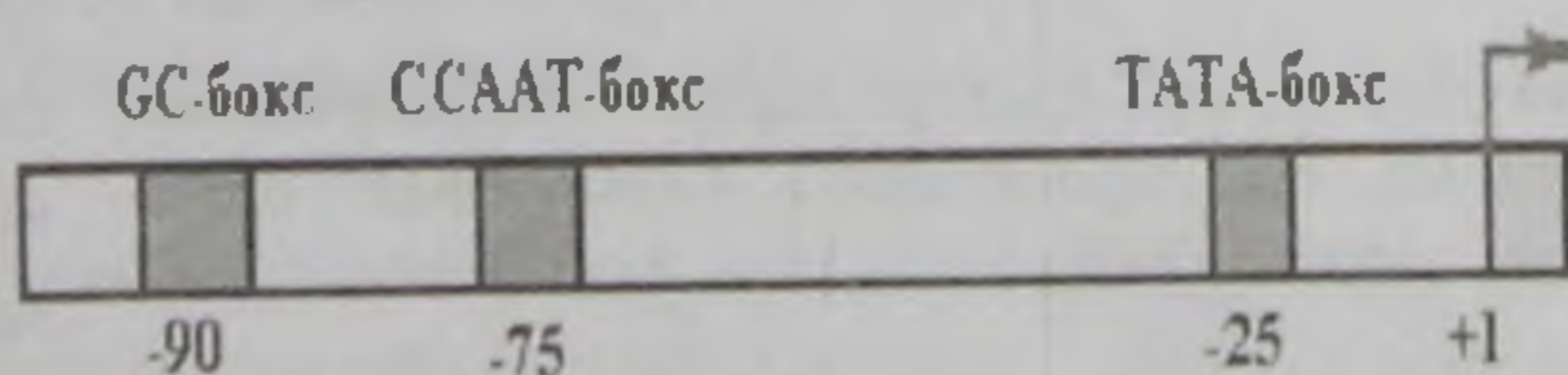


Рисунок 13.9. Промотор и элементы инициации в некоторых структурных генах эукариот.

ным сигналам типа температурного увеличения или присутствия гормона. Таким образом, способность клеток активизировать или подавлять транскрипцию специфических структурных генов необходимо для поддержания специфики клетки и сохранения клеточной энергии.

В отличие от прокариот, в эукариотах опероны не обнаружены. Поэтому в клетках эукариот каждый структурный ген имеет свой собственный набор "элементов управления".

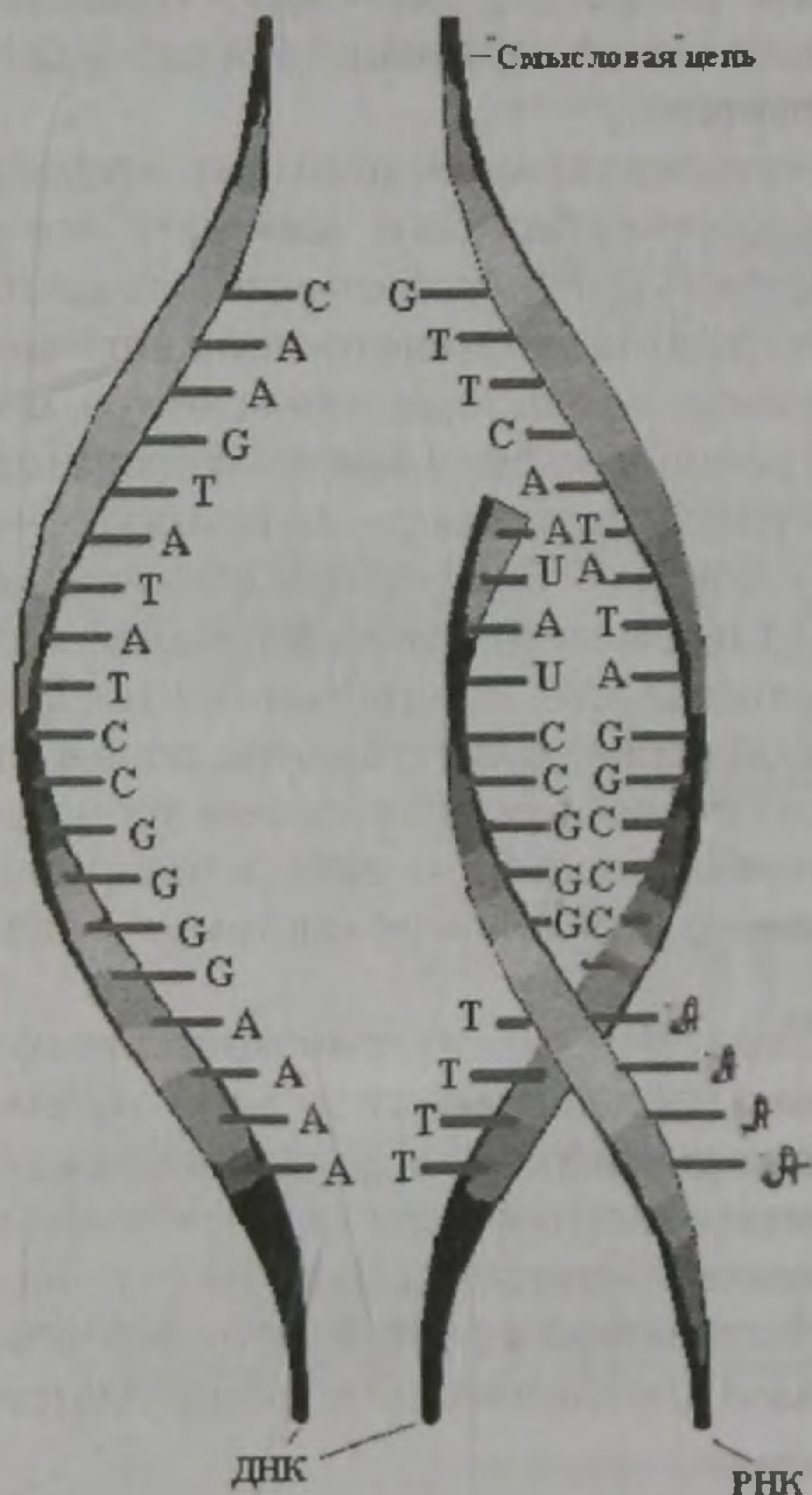


Рисунок 13.10. Синтез гяРНК. Генетическая информация, закодированная в "смысловой" цепи ДНК передается гяРНК.

Для регулирования транскрипции у эукариот важны взаимодействия типа ДНК-белок и белок-белок. Процесс транскрипции для эукариот протекает условно в 2 этапа:

- а) синтез гяРНК, который состоит из экзонов и интронов (рис. 13.10.);
- б) процессинг мРНК, при котором, благодаря сплайсингу из гяРНК на мРНК транскрибируются только экзоны (рис. 13.11.).

Структурный ген эукариот (рис. 13.9.) имеет промоторную последовательность, которая включает ТАТА-последовательность, ССААТ-последовательность ("cut" box) и последовательность повторных нуклеотидов GC (GC box). От начала инициации (+1) эти боксы лежат на расстоянии -25, -75 и -90 н.п.

Первый шаг в иницировании транскрипции эукариотических структурных генов с ТАТА – промотором – это закрепление фактора транскрипции JJD (TFJJD или ТАТА – закрепляющий белок - ТЗБ), который представляет собой комплекс, включающий в себя, по крайней мере, 14 белков. Впоследствии, другие факторы транскрипции связываются с TFJJD и ТАТА – боксом ДНК. После чего РНК – полимераза II, которая имеет ориентир к структурному гену, связывается с комплексом транскрипции и, "пусковой механизм" транскрипции начинает действовать на участке +1.

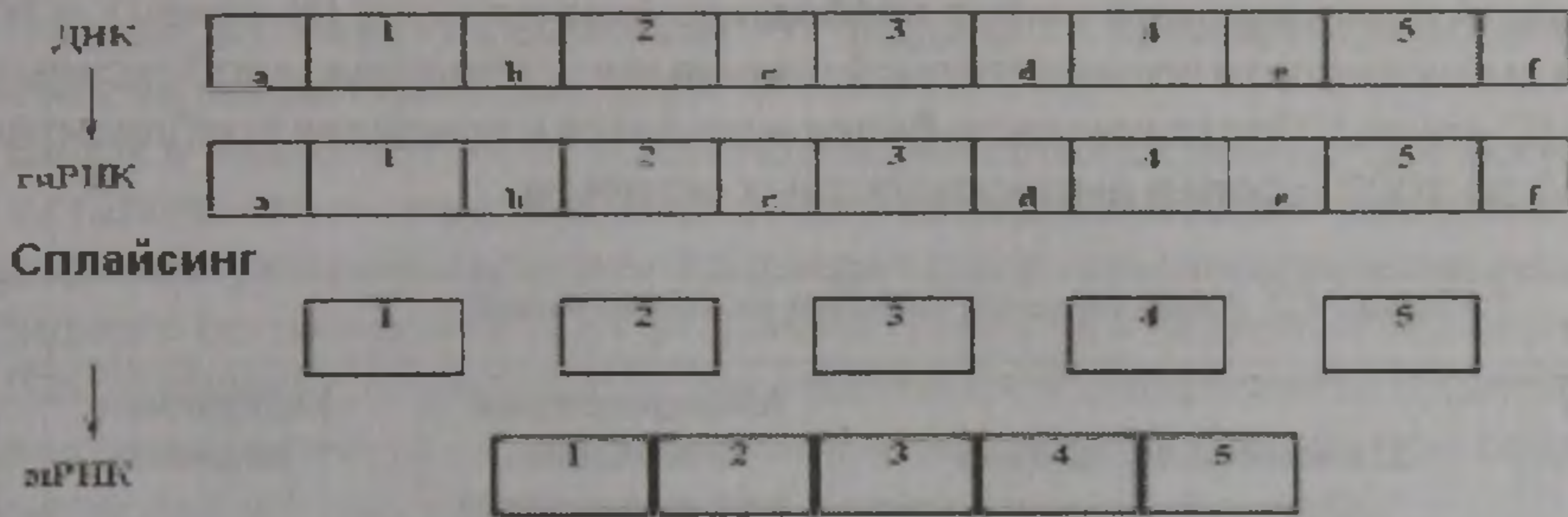


Рисунок 13.11. Упрощенная схема сплайсинга: 1, 2, 3, 4, 5 – экзоны; а, b, с, d, e, f – интроны.

13.5. Трансляция

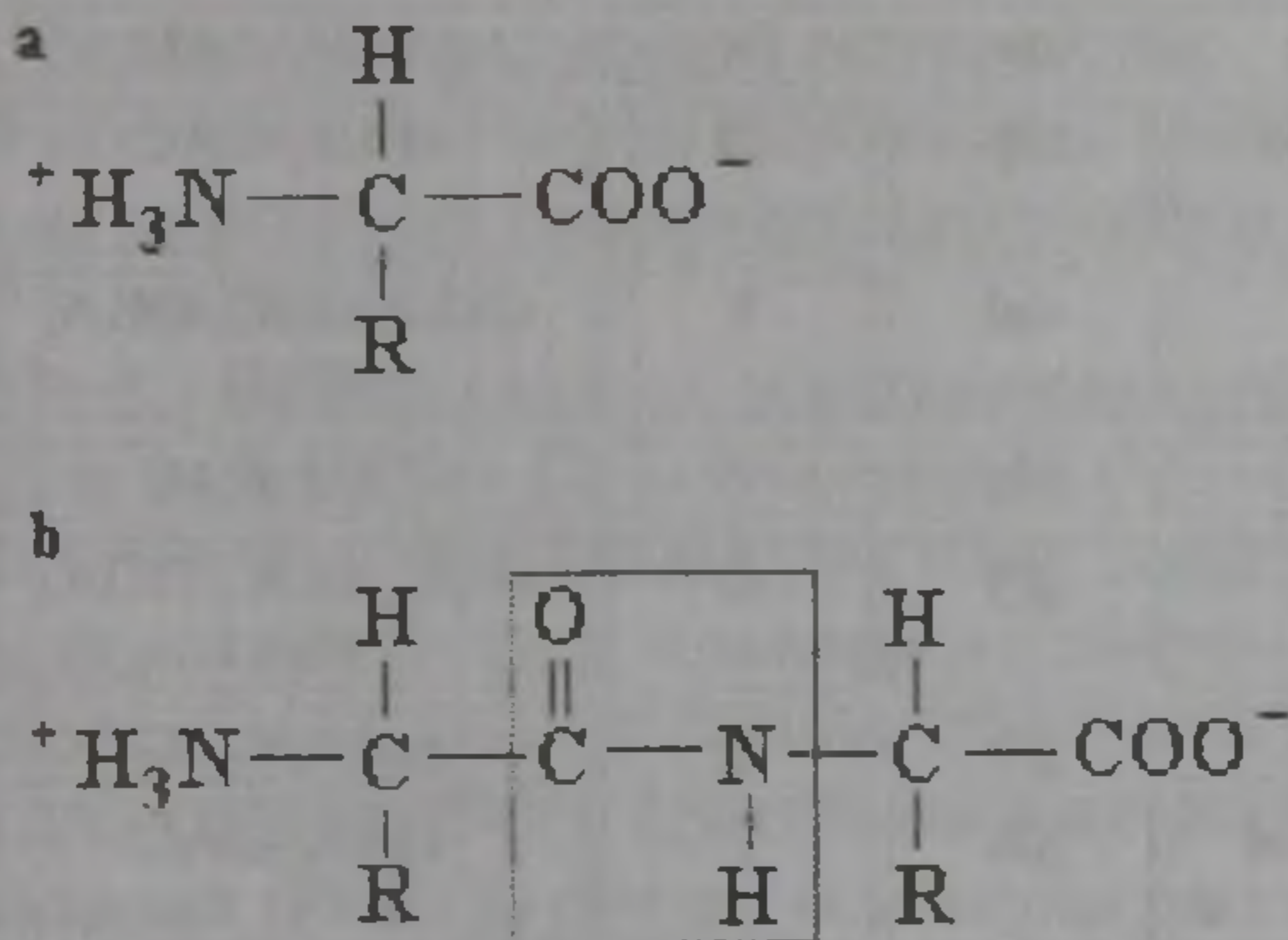


Рисунок 13.12. Обобщённая структура аминокислоты (а) и пептидной связи (b), которая образуется в результате реакции конденсации.

Трансляция – это перевод информации, заложенной в кодонах мРНК в аминокислотную последовательность полипептидной цепи. Трансляция является мощным фактором функциональной интеграции гено типа, так как благодаря этому процессу клетка обеспечивается всеми белками.

Белок. Белки – это необходимые полимеры, которые вовлечены почти во все биологические функции. Они катализируют химические реакции, являются транспортными молекулами в пределах клетки, управляют мембранную проходимость;

питают клетку и в целом, весь организм; обеспечивают защиту против инфекционных заболеваний. Белок состоит из последовательных единиц, называемых аминокислотами.

Аминокислоты имеют схожую химическую организацию. Как видно из рисунка 13.12, для аминокислот характерен центральный атом углерода, который имеет водород (H), карбоксильную группу (COO⁻), аминогруппу (NH₃⁺) и R-группу. Например, если вместо R будет стоять метильная группа (CH₃), то соответствующая аминокислота будет отнесена к аланину. В международной символике аминокислоты обозначаются одной или тремя буквами (табл. 13.2.).

В белке аминокислота связана со смежной аминокислотой. При этом карбоксильная группа одной аминокислоты присоединяется к аминогруппе смежной аминокислоты, такая связь называется пептидной.

Первая аминокислота имеет свободную аминогруппу (N-конец), а последняя аминокислота полипептидной цепи имеет свободную карбоксильную группу (С-конец). Протяженность белка находится в пределах приблизительно от 40 до 1000 и более аминокислотных остатков.

Таблица 13.2. Аминокислоты белков и их обозначения.					
№	Наименование на языке		Международное обозначение с использованием		Кодируемые кодоны
	русском	английском	3 ^х букв	1 ^я буквы	
1.	аланин	alanine	ala	A	GCU, GCC, GCA, GCG
2.	аргинин	arginine	arg	R	CGU, CGC, CGA, CGG, AGA, AGG
3.	аспарагин	asparagine	asn	N	AAU, AAC
4.	аспарагиновая кислота	aspartic acid	asp	D	GAU, GAC
5.	валин	valine	val	V	GUU, GUC, GUA, GUG
6.	гистидин	histidine	his	H	CAU, CAC
7.	глицин	glycine	gly	G	GGU, GGC, GGA, GGG
8.	глутамин	glutamine	gln	Q	CAA, CAG
9.	глутаминовая кислота	glutamic acid	glu	E	GAA, GAG
10.	изолейцин	isoleucine	iso	I	AUU, AUC, AUA
11.	лизин	lysine	lys	K	AAA, AAG
12.	лейцин	leucine	leu	L	UUA, UUG, CUU, CUC, CUA, CUG
13.	метионин	methionine	met	M	AUG
14.	пролин	proline	pro	P	CCU, CCC, CCA, CCG
15.	серин	serine	ser	S	UCU, UCC, UCA, UCG, AGU, AGC
16.	тирозин	tyrosine	tyr	Y	UAU, UAC
17.	триптофан	tryptophan	trp	W	UGG
18.	треонин	threonine	thr	T	ACU, ACC, ACA, ACG
19.	фенилаланин	phenylalanine	phe	F	UUU, UUC
20.	цистеин	cysteine	cys	C	UGU, UGC
	терминатор	terminator	term		UAA, UAG, UGA

Последовательность аминокислот, входящих в полипептидную цепь, составляет ее *первичную структуру*.

Белок в зависимости от местоположения определенных аминокислотных остатков и полного аминокислотного состава способен складываться в специфическую конфигурацию. Такая пространственная организация полипептидного остова формирует *вторичную структуру* белковой молекулы.

Законченная трехмерная организация всех атомов полипептидной цепи формирует *третичную*, а образование мультимерных белков при соединении нескольких полипептидных цепей *четвертичную структуру*.

Трансляционная система клеток. Трансляция осуществляется на рибосомах при взаимодействии следующих молекул: мРНК, тРНК, рРНК и большого количества белковых факторов.

Рибосома – это минифабрика, которая, передвигаясь вдоль матрицы, осуществляет синтез пептидных связей. В состав рибосом входит 40% белка и 60% рРНК. Количество рибосом в клетке находится в прямой зависимости с белоксинтезирующей активностью.

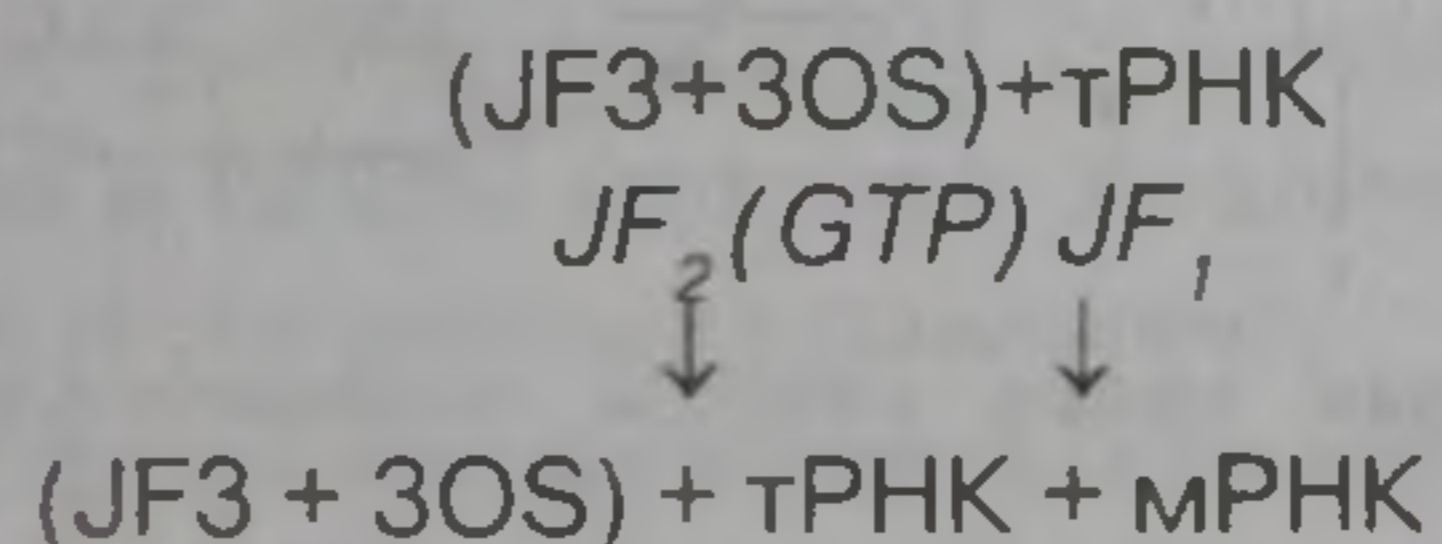
Рибосома состоит из 2 субчастиц: малой и большой. При пептидном синтезе на рибосомах различают два участка: участок А – акцепторный, и участок Р – докторский.

тРНК – это посредник, обеспечивающий связь кодонов с аминокислотами.

Для каждой из 20 аминокислот существует специализированная тРНК (тРНК^A, тРНК^R и тд.). Молекулы тРНК содержат около 80 нуклеотидов, в конфигурации имеют вид «клеверного листа» и обладает важными структурными свойствами: 1) на 3' - конце тРНК расположен сайт рСрСрАоп, необходимый для ковалентного присоединения аминокислоты с помощью фермента аминоацил тРНК; 2) внутри молекулы располагается петля (актикодон).

Синтез всех полипептидных цепей всегда начинается с метионина и протекает в направлении от N_f к С-концу (рис. 13. 13.). При этом инициация происходит всегда при участии тРНК^{met}. Инициация синтеза полипептидной цепи начинается с присоединения малой рибосомной субъединицы к соответствующему центру связывания на мРНК (кодон AUG). При взаимодействии этого кодона с антикодоном происходит связывание N-формилметионил-тРНК^{Met}

(f-Met-tRNA^{Met}_F) с участием трех белковых факторов инициации: JF₁, JF₂, JF₃ по схеме:



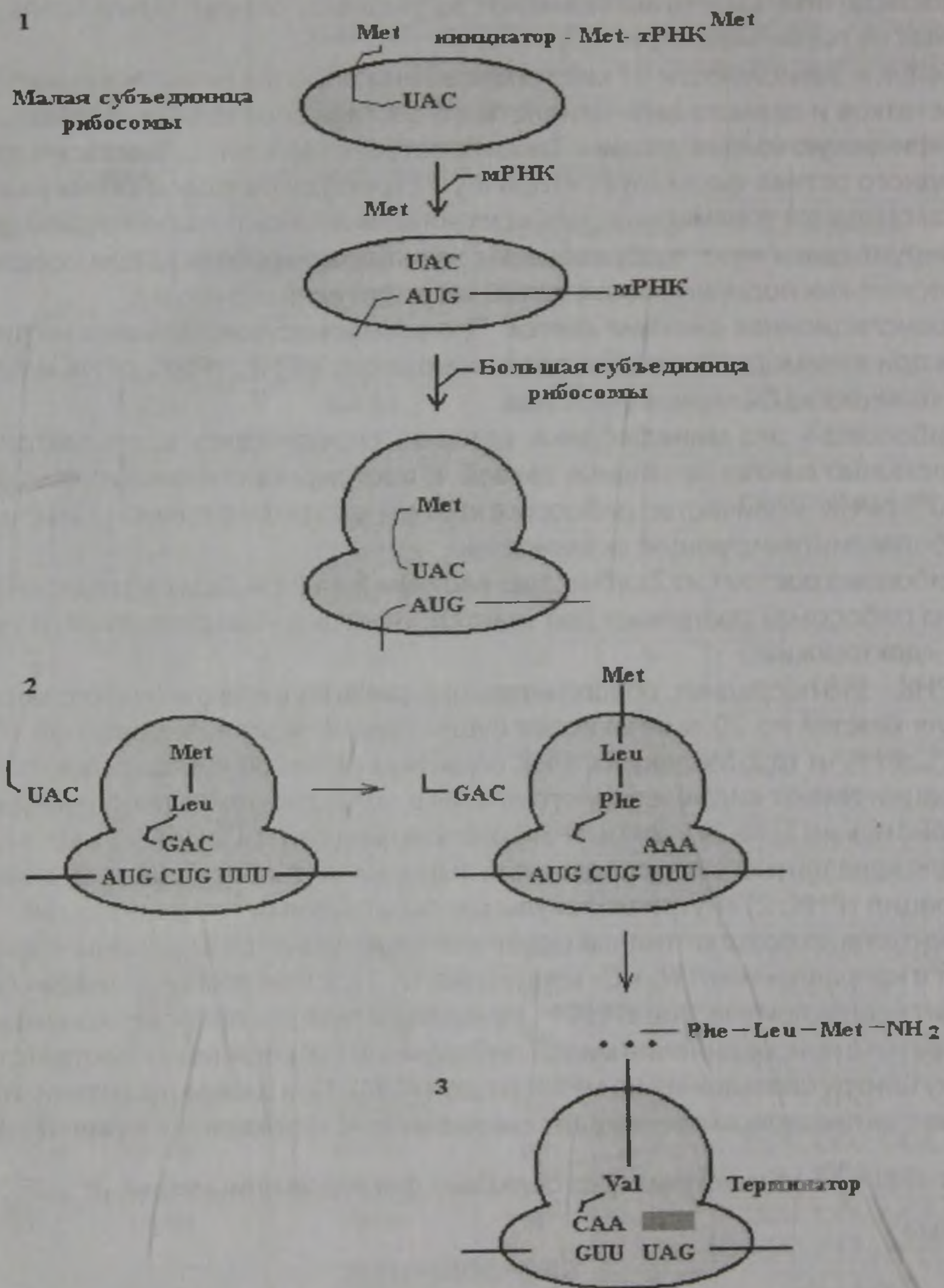


Рисунок. 13.13. Общая схема синтеза полипептидной цепи в клетках эукариот.

1 – формирование комплекса инициации; 2 – элонгация; 3 – терминация.

В большой субъединице находится два участка связывания тРНК – это Р-участок (для пептидил-тРНК) и А-участок (для аминоацил-тРНК). Иницирующая N-формилметтионин-тРНК^{met} прикрепляется к Р-участку. При этом,

следующий кодон, стоящий в последовательности мРНК попадает в А-участок, где происходит его взаимодействие с аминоксил-тРНК, несущий подходящий антикодон.

Следующая стадия синтеза полипептида представляет собой многократное повторение цикла присоединения очередной аминоксилоты к растущей полипептидной цепи. Схематично этот процесс можно расписать в следующей последовательности:

1. *Формирование комплекса инициации.* Инициатор тРНК (Met- tRNA^{met}) связывается с малой субъединицей, затем мРНК передвигается вдоль комплекса до антикодона (UAC) инициатора тРНК, образуя «пару» с начальным кодоном (AUG) мРНК. Большая рибосомальная субъединица с целью формирования комплекса инициации объединяется с мРНК – инициатором тРНК – малой рибосомальной субъединицей.

2. *Элонгация* протекает по следующей схеме:

2.1. Второй кодон (CUG) основывает пару с антикодоном (GAC) Zeu – tRNA^{Zeu}.

2.2. Метионин инициатора тРНК присоединившись к лейцину с помощью Zeu – tRNA^{Zeu} образует пептидную связь, а «отработанный» инициатор тРНК «изгоняется» из рибосомы.

2.3. Перемещение пептидил – тРНК и мРНК в пептидную сторону от аминоксилальной ведет к освобождению аминоксилного центра для следующего кодона. (UUU).

2.4. Третий кодон (UUU) образует пару с антикодоном (AAA) Phe-tPRN^{Phe}.

2.5. Лейцин пептидил – тРНК соединяется с помощью пептидной связи, а отработанная Zeu-tRNA^{Zeu} удаляется из рибосомы.

3. *Терминация.* Стоп – кодон (UAG а также UAA, UGA) взаимодействует с терминирующим фактором, который ведет к завершению трансляции. Последняя тРНК освобождает пептидную цепь из рибосомы. Рибосомы подвергаются воздействию фактора рециркуляции, которая ведет к разделению субъединиц рибосомы.

Синтез белка – это быстрый процесс, скорость элонгации составляет при 37°C для прокариот, в среднем, 15 аминоксилот для эукариот – 2 аминоксилоты в секунду.

Полный генетический код состоит из 64 кодов. Три из этих кодонов представлены «терминаторами» и один (AUG) – «инициатором». Имеется один кодон для аминоксилоты триптофан (UGG). Для остальных аминоксилот белка имеется по два, четыре и шесть кодонов. Различные кодоны по степени использования действуют в организмах различно.

Например, из четырех кодонов глицина больше всего используется клеткой человека (33%) кодон GGC, а меньше всего (18%) - кодон GGU.

После трансляции белок с помощью различных способов может видоизменяться. У эукариот полученные пептидные цепи могут либо «дробиться» на более меньшие цепи, либо присоединяют к себе фосфаты, липиды, углеводы или другие низкомолекулярные соединения. Такие химические дополне-

ния создают белки, которые "добиваются" определенных клеточных действий.

Резюме

ДНК – это молекула, ответственная за установление и поддержание клеточных и биохимических функций организма. Два процесса – репликация и синтез белка определяют сущность биологической системы. Благодаря первому процессу сохраняется преемственность, второму – жизнедеятельность. В комплексе эти два процесса вносят эволюционные преобразования, суть которого сводится к возникновению, поддержанию и сохранению биологического разнообразия.

Молекулярная биотехнология использует ДНК от различных организмов. Все методы молекулярной биотехнологии в животноводстве направлены на создание методом трансгеноза таких животных, которые бы отличались, во-первых, не свойственными, но полезными показателями продуктивности и, во-вторых, имели бы высокую запрограммированную человеком резистентность к инфекционным болезням.

Корректировка биологической программы сельскохозяйственных животных на молекулярном уровне возможно только при наличии глубоких и разносторонних знаний в области наследственности и изменчивости всего генетического разнообразия, имеющегося в природе.

Ключевые слова и понятия:

Белок	Репликационная вилка
Ген	Репликация
Генетический код	Рибосома
гРНК	РНК
ДНК	Синтез белка
Инициатор	Сплайсинг
Инtron	ТАТА-бокс
Килооснование	Терминатор
Мегаоснование	Транскрипционная единица
мРНК	Транскрипция
Нуклеотидная пара	Трансляция
Оперон	тРНК
Процессинг	Экзон

Контрольные вопросы:

1. Описать химическую структуры ДНК по Уотсону и Крику.
2. Сравнить и противопоставить между собой молекулы ДНК и РНК.
3. Обсудить основные особенности репликации ДНК.
4. Какими свойствами обладает молекула ДНК?

5. Какие функции выполняет молекула ДНК в клетке?
6. Какие функции выполняет молекула РНК?
7. Какими свойствами обладает молекула РНК?
8. Описать различия между про- и эукариотными структурными генами.
9. Какова биологическая сущность транскрипционной единицы эукариот?
10. Описать транскрипцию.
11. Что собой представляет ТАТА – бокс?
12. Какова биологическая сущность транскрипционной единицы прокариот?
13. Что подразумевают под термином “оперон”?
14. Каково биологическое значение оперона?
15. Обсудить три различных способа регулирования транскрипции в прокариотах.
16. Описать главные ДНК элементы, которые являются ответственными за транскрипцию эукариотических структурных генов.
17. Описать трансляцию генетического кода.
18. Дать разъяснение основным свойствам генетического кода.

Рекомендуемая литература. Молекулярные основы наследственности очень хорошо отражены в следующих работах: Б.Льюин, Москва, 1987г. Гены, Ф.Айала и Дж.Кайгера, Москва, 1987г. Современная генетика, 1-3т. Среди зарубежных авторов стоит обратить внимание на следующие работы: Kozak, M. 1991. Structural features in eukaryotic mRNAs that modulate the initiation of translation; Lodish, H., D. Baltimore, A. Berk, S. L. Zipperer, P. Matsudaira, and J. Darnell. 1995. *Molecular Cell Biology*, 3rd ed. Scientific American Books, Inc., New York, N.Y.; Nakamura, Y., K. Ito, and L. A. Isakson. 1996. Emerging understanding of translation termination.; Tate, W. P., and C. M. Brown. 1992. Translational termination: «stop» for protein synthesis or «pause» for regulation of gene expression.

Глава 14. Рекомбинантная ДНК

Цель: Ознакомиться с технологией рекомбинантной ДНК.

После изучения главы студент сможет:

- иметь общее представление о рекомбинантных молекулах, принципах их конструирования и клонирования;
- дать разъяснение методам получения и идентификации генов;
- раскрыть общую схему синтеза олигонуклеотидов;
- объяснить действие полимеразной цепной реакции;
- иметь твердую теоретическую базу по основам молекулярной биотехнологии.

Детальное описание работ, связанных с микроманипуляциями на уровне молекул не входит в задачу этой книги. Здесь считается целесообразным, дать лишь общие представления, которые помогли бы читателям, изучающих клеточные технологии *in vitro*, понять молекулярную процедуру и ее роль в получении организмов с новыми наследственными программами.

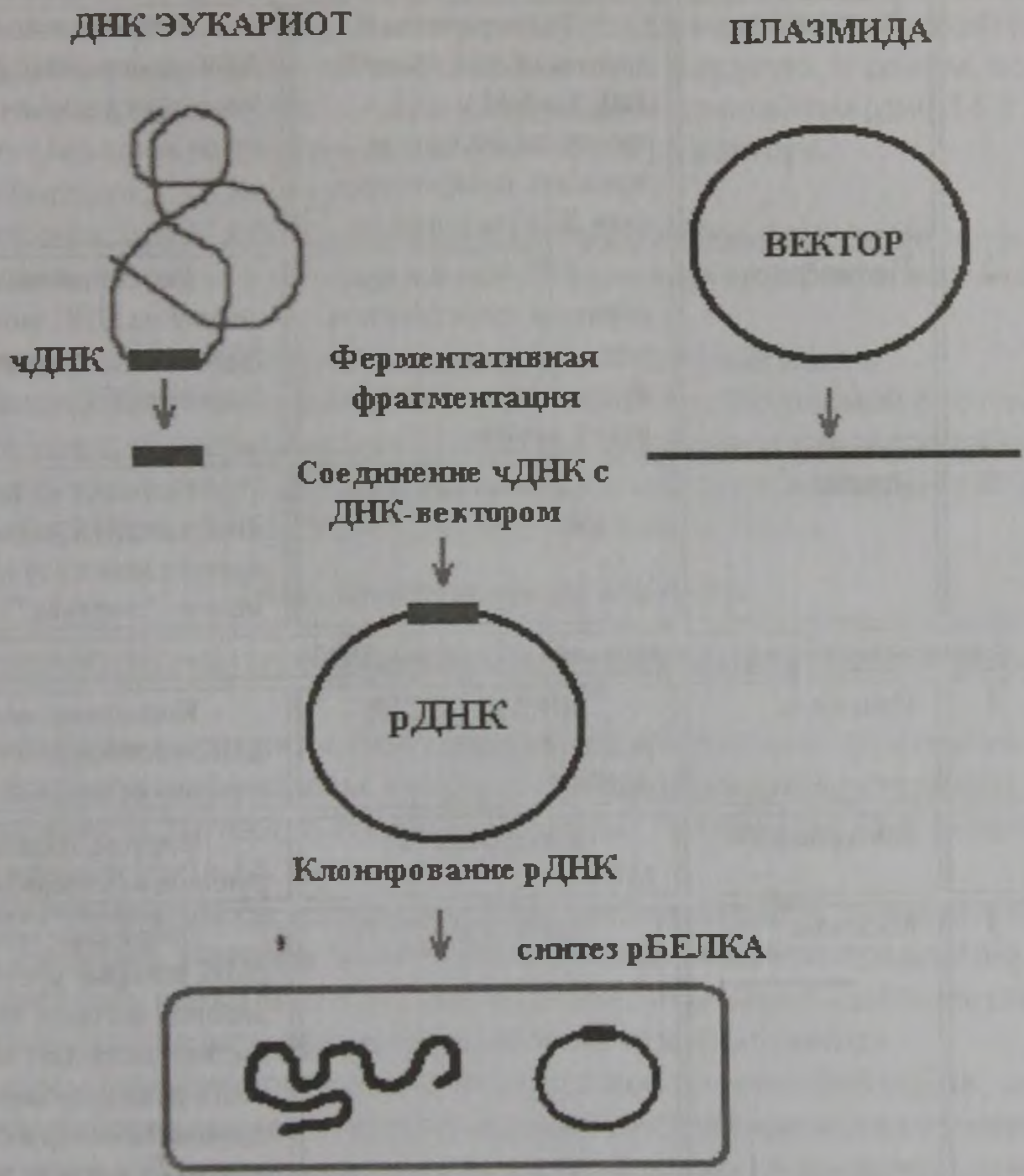
14.1. Рекомбинантная ДНК

Применение методов молекулярной биотехнологии в широком диапазоне стало возможным благодаря теоретическим разработкам и научному прогрессу в области молекулярной биологии, генетики и вирусологии.

Рекомбинантная ДНК (рДНК) – это сконструированная в условиях *in vitro* кольцевая молекула, состоящая из ДНК различного происхождения: рДНК = ДНК эукариот + ДНК прокариот (и/или ДНК вирусов). В составе рДНК фрагмент из ДНК эукариот представляет собой чужеродную ДНК (чДНК), которая является структурным или регуляторным геном. А фрагмент из ДНК прокариот или ДНК вируса представляет собой вектор и выполняет функцию “молекулярного такси”, так как является переносчиком чДНК, обеспечивая механизм репликации и экспрессии. Другими словами, вектор – это естественный репликон небольших размеров. Различают три класса векторов – это плазмиды, бактериофаги и космиды.

Для эффективного выполнения своей роли вектор должен отвечать определенным требованиям: во-первых, быть репликоном, чтобы стабильно существовать в клетке; во-вторых, иметь селективный маркер для идентификации в реципиентных клетках и, в-третьих, иметь сайты узнавания для ферментов-рестриктов с целью изоляции встроенного чДНК.

Большинство векторов носит специализированный характер, так как их приспособливают для решения узкого круга задач (векторы для амплификации, векторы для клонирования, векторы для секвенирования, векторы для секреции продуктов клонируемых генов и т.д.).



ИДЕНТИФИКАЦИЯ И КЛОНИРОВАНИЕ

Рисунок 14.1. Схема конструирования рекомбинантной ДНК, иллюстрирующая выделение чДНК, встраивание его в вектор, клонирование и, при необходимости, получение клонируемого белка.

Таблица 14.1. "Инструменты" молекулярной биотехнологии

Ферменты воздействуют на молекулу ДНК			
№	Фермент		Общая характеристика
	класс	наименование	
1	Рестриктазы	Эндонуклеазы II группы (EcoRI; BamHI; PstI; SmaI/SalI и др.), щелочная фосфатаза, нуклеаза, панкреатическая ДНКаза и другие.	Разрезают молекулу ДНК на основные фрагменты (ферменты – "ножницы").
2	Полимеразы	ДНК-полимераза, обратная транскриптаза, терминальная дезокси-нуклеотидил трансфераза и другие.	Восстанавливают молекулу оцДНК, заполняют "бреши" и т.д. (ферменты – "строители").
3	Лигаза	РНК-лигаза, ДНК-лигаза	Сшивают фрагменты РНК или ДНК, образуя единую молекулу (ферменты – "портные").
Векторы переносят, размножают и хранят чДНК			
1	Плазмиды	pBR322; pUC19; pSP3; pLc2833; pKN402.	Кольцевые молекулы ДНК, состоящие из 10-30 тыс. пар оснований.
2	Бактериофаги	Бактериофаг λ; M13.	Вирусы, паразитирующие в бактериях.
3	Космиды	pLFR-5; BAC; PI.	Гибридные молекулы ДНК, которые могут жить двойной жизнью. Их плазмидная часть дает возможность реплицироваться и проводить отбор в бактериальных клетках, а часть, которая принадлежит геному фага λ, обеспечивает их упаковку в оболочку фага и трансдукцию в реципиент за счет инфекционных свойств этого фага.

Благодаря своему составу рДНК способна трансформировать клетку, реплицироваться там (автономно или в составе хромосомы) и экспрессироваться. Поэтому создание рДНК полезно лишь в том случае, если рДНК смо-

жет “вжиться” в клетку хозяина. При этом важным условием для рДНК является то, что, *во-первых*, в ней содержится биологически важная информация (чДНК), которая обеспечивает направленное биохимическое обслуживание клетки и, *во-вторых*, в ней имеется ДНК-последовательность (вектор), обеспечивающая размножение чужеродного гена в клетках хозяина.

Из всего вышеизложенного следует, что технология рДНК включает в себя серию экспериментов, ведущие к переносу созданной генетической информации (рДНК) от одной биологической системы в другую. В целом, вся технология по созданию рДНК следует следующим принципам (рис. 14.1.):

1. Получение гена (чужеродный ген – чДНК) и вектора.
2. «Конструирование» рДНК.
3. Перенос рДНК в бактериальную клетку (клетка-реципиент).
4. Идентификация и изоляция трансформированных бактериальных клеток.
5. Клонирование рДНК и ее практическое использование.

Как видно из рисунка, для работы в области молекулярной биотехнологии необходимо применение “инструментов”, одни из которых способны воздействовать на молекулу ДНК (ферменты), другие способны переносить, размножать и хранить чужеродную ДНК (векторы; табл. 14.1.).

14.2. Ферменты-рестрикты

При молекулярном клонировании используются следующие группы ферментов:

- 1) ферменты-рестрикты, благодаря которым получают фрагменты ДНК;
- 2) ферменты-полимеразы, которые необходимы для синтеза ДНК;
- 3) ферменты-лигазы, с помощью которых соединяют ДНК различного происхождения (табл. 14.1.).

Раскрытие вопросов, касающихся энзимологии рДНК не входит в задачу этого учебника, поэтому заинтересованному читателю предлагаю обратиться к работам, указанных в рекомендуемой литературе. Здесь же раскрываются только принципы применения ферментов-рестриктов.

Так, для молекулярного клонирования оба источника ДНК (чДНК, вектор) должны быть последовательно сокращены в дискретные и восстанавливаемые фрагменты. Для этой цели используются ферменты, выделенные из различных бактерий и отнесенные ко второй группе рестриктов эндонуклеаз.

Таблица 14.2. Схема действия ферментов-рестриктов

Фермент	Сайт-рестрикции	Концевые участки молекулы ДНК
EcoRI	G * A – A – T – T – C C – T – T – A – A * G	“липкие”, с выступающим 5’- однонитевыми концами
HpaI	G – A – A * T – T – C C – T – T * A – A – G	“тупые”, концы фрагментов двунитевые

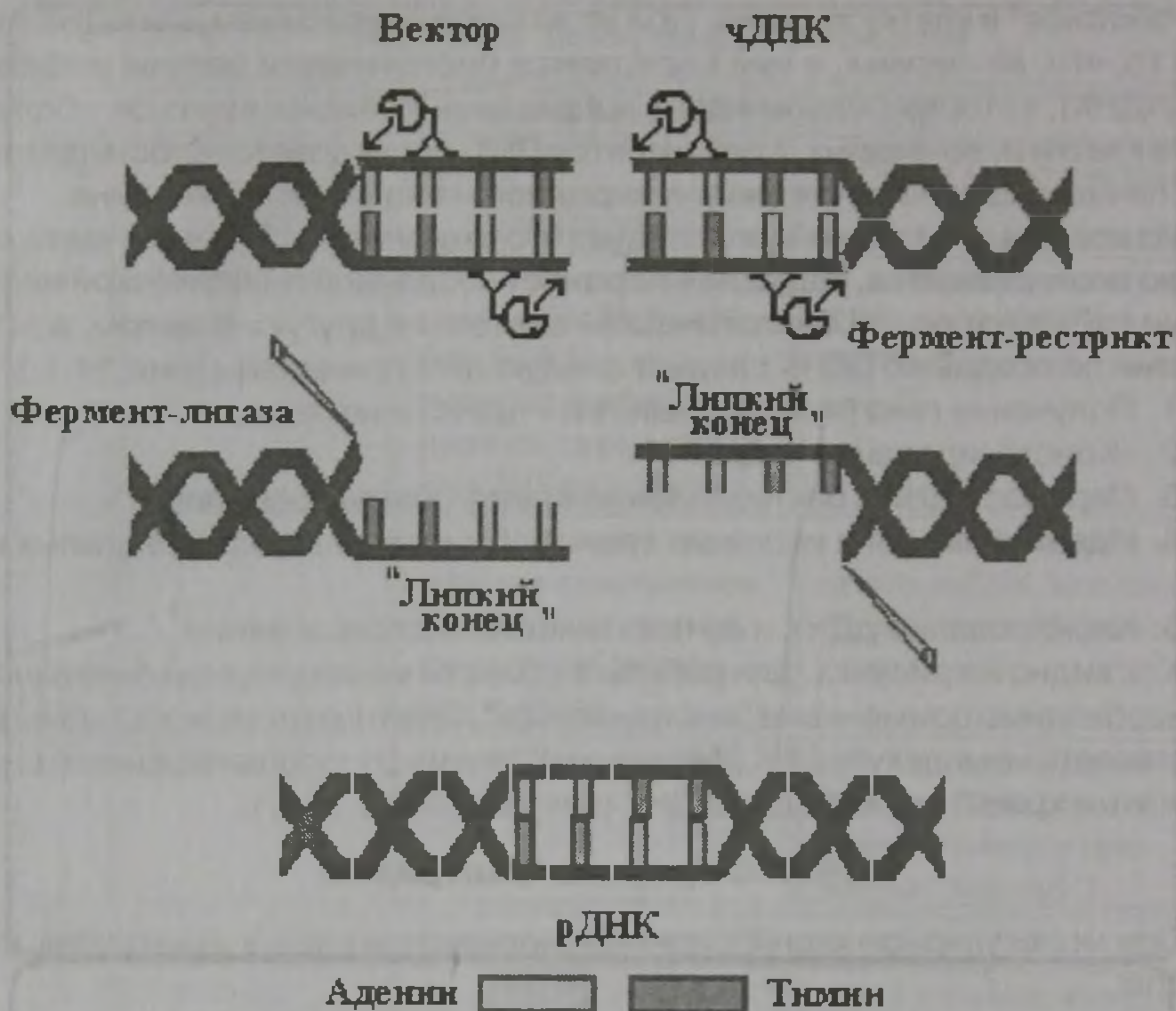


Рисунок 14.2. Образование "липких" концов в молекулах чДНК и вектора.

Для всех выделенных ферментов рестриктов общим является то, что они действуют на конкретные участки ДНК, которые представлены палиндромами и названные сайтом узнавания для рестриктов (сайты-рестрикции). Длина сайтов для различных ферментов варьирует от 4 до 8 и более н.п. При этом рестрикты могут воздействовать на ДНК с образованием "липких" и "тупых" концов (табл. 14.2.).

Как видно из таблицы, фермент *EcoRI* воздействует на каждую цепь ДНК между гуаниновыми и адениновыми основаниями сайта. Такой симметрический раскол ДНК ведет к образованию одноцепочечных "липких" концов, каждый из которых включает по четыре нуклеотида. На рисунке 14.2. показана упрощенная схема действия фермента *EcoRI*, который ведет к образованию "липких" концов. Фермент *HpaI* воздействует на сайт посередине с образованием двунитевого "тупого" конца.

В настоящее время от различных бактерий выделены более двухсот ферментов-рестриктов. Принципы, по которым им даются названия те же, что и для *EcoRI*: заглавной буквой указывается принадлежность к роду, двумя прописными буквами – разновидность (обозначение штамма часто опускается), а римскими цифрами – ферментативная характеристика.

14.3. Векторы клонирования

Коллекция клонируемых молекул ДНК, включающая не менее одного экземпляра каждой последовательности генома, называют *банком генов* (или библиотекой генома). При создании банка гена необходимо нужную последовательность ДНК сначала клонировать, а затем отобрать. Для этой цели полную ДНК дробят на отдельные фрагменты с помощью рестриктов, затем эти фрагменты вставляются в вектор и подвергаются клонированию и селекции. Идентифицированные и изолированные линии клеток подвергаются описанию с целью дальнейшего хранения. Для хранения применяют векторы бактериофаги и космиды.

Процесс дробления геномной ДНК на клональные элементы, встраивание в вектор и вставка в бактериальные клетки (хозяин) относят к процессу создания библиотеки генома (банк гена). Полная библиотека генома содержит всю геномную ДНК исходного организма. Такая коллекция, как было отмечено выше, будет включать не менее одного экземпляра каждой последовательности генома.

В качестве примера рассмотрим упрощенную схему создания библиотеки генома. Допустим, что ДНК исходного организма подвергается фрагментации с помощью эндонуклеаз (например, *SauSAI*), который теоретически раскалывает ДНК приблизительно на четыре равные сегменты, длина каждого из которых составляет 256 н.п. Если же какие-либо сегменты слишком велики для их дальнейшего клонирования, что затрудняет создание библиотеки, то для его раздробления применяют другие группы рестриктов. Полученные фрагменты затем сравниваются с картой.

После того, как библиотека создана, клоны с чДНК должны быть идентифицированы. Различают три метода идентификации, здесь же в упрощенной версии расписан метод ДНК-гибридизации. Этот метод основан на формировании устойчивых пар между зондом и ДНК-мишенью. Зонд – это одноцепочечная (оц) молекула нуклеиновой кислоты, содержащая радиоактивную метку (^{32}P). Принцип метода основан на том, что при нагревании происходит денатурация ДНК, а при медленном охлаждении – ренатурация ДНК. Помещая в такой раствор ДНК-зонды и ДНК-мишень благодаря радиоактивным меткам путем радиофотографии можно выявить гибридные ДНК-молекулы. В среднем, длина зондов варьирует в пределах от 100 до 1000 и более н.п. Для получения устойчивой гибридной ДНК-молекулы необходимы зонды в пределах 50 оснований. В этом случае образование водородных связей осуществляется в более чем 80% случаях.

Как уже было сообщено выше, различают три группы векторов, применяемых при молекулярном клонировании – это плазмиды, бактериофаги и космиды. Векторы-плазмиды используют для клонирования ДНК-молекулы длиной до 10kb, бактериофаги – это векторы, вмещающие фрагменты чДНК до 20kb, а космиды – от 40kb и более (табл. 14.1.).

Плазмида. Плазмида – это независимая экстрахромосомальная кольцевая двуспиральная ДНК-молекула, способная к автономной репликации. В зависимости от биологической сущности плазмиды в бактериях выполняют различные функции (F-плазмиды определяют пол, R – плазмиды обеспечивают высокую сопротивляемость к антибиотикам, “вырождающиеся” плазмиды несут определенные наборы генов для утилизации необычных обменных про-

цессов, "загадочные" плазмиды не имеют очевидных функциональных фенотипических проявлений). Размеры плазмид могут составлять от одного и менее до 500 и более kb. Количество плазмид на бактериальную клетку может составлять от 1 до 4 (низкое число копий) и от 10 до 100 (высокое число копий). В целом же, на долю плазмидной ДНК приходится приблизительно 0,1 – 5,0% от общего количества ДНК бактерий.

В зависимости от репликационного механизма различают плазмиды с узким (реплицируются только в одних видах бактерий) и широким (реплицируются в различных видах бактерий) диапазоном распространения в бактериальных клетках. Кроме того, по сосуществованию плазмиды условно делят на совместимые и несовместимые (различные типы плазмид могут или не могут сосуществовать в одной бактериальной клетке).

Использование плазмид в качестве векторов с целью генетического конструирования рекомбинантных молекул стало возможным благодаря следующим особенностям:

- 1) небольшой размер;
- 2) уникальность воздействия ферментов - рестриктонов на те сайты, в которую встроены чДНК;
- 3) наличие одного или более селективируемых генетических маркеров, необходимых для идентификации в реципиентных клетках.

Важной биологической особенностью для плазмид является то, что репликация поддерживается только в бактериальных клетках. Поэтому ввод рДНК в клетку бактерии является важным условием в получении успешных результатов.

Ниже приводятся характеристики двух наиболее часто используемых векторов плазмидного происхождения.

Вектор pBR322. Плаزمида содержит в себе

4,361 н.п. В составе плазмиды имеются два гена, которые определяют его резистентность к антибиотикам ампициллину (Amp^r) и тетрациклину (Tet^r). Первый ген имеет сайт рестрикции для фермента PstI, второй – для BamHI, HindIII и Sall. Кроме того, на плазмиде имеется сайт для фермента EcoRI, а также участок, ответственный за начало репликации - ori (рис. 14.3.).

Для получения рекомбинантной молекулы плазмиду pBR322 и чДНК рестрицируют ферментом BamHI, смешивают и воздействуют ферментом ДНК-лигаза в присутствии АТФ. В результате чДНК встраивается в ген Tet^r и полученная конструкция становится чувствительной к тетрациклину (поэтому в конструкцию плазмиды были внесены дополнительные

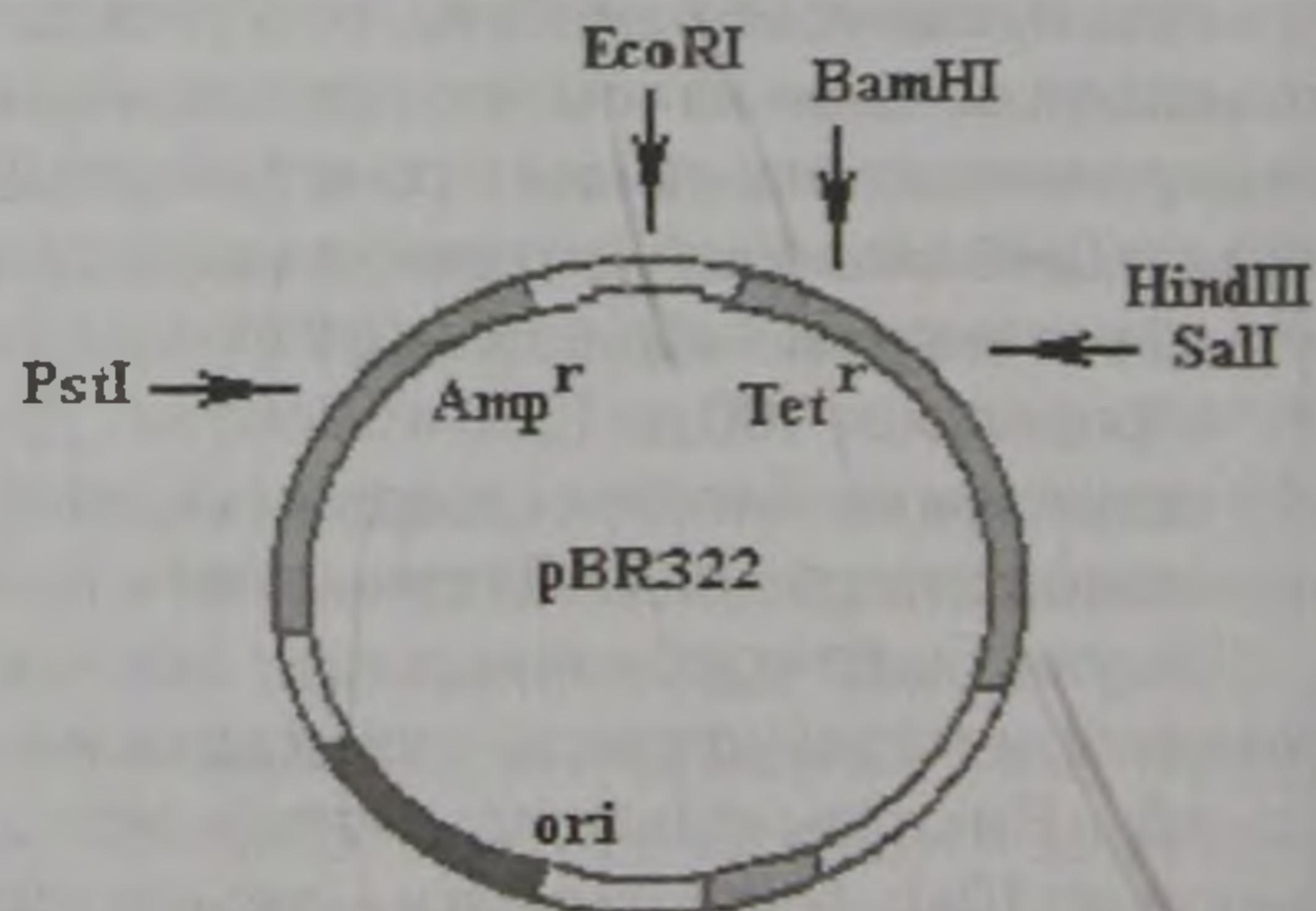


Рисунок 14.3. Упрощенная схема генетической карты плазмиды pBR322.

Дополнительные сайты рестрикции для ферментов PstI, EcoRI, BamHI, HindIII и Sall. В результате чДНК встраивается в ген Tet^r и полученная конструкция становится чувствительной к тетрациклину (поэтому в конструкцию плазмиды были внесены дополнительные

модификации, которые в дальнейшем обеспечивают успех в отборе плазмид с рДНК конструкцией). Затем сконструированная рДНК при высокой температуре (42°C) и наличии CaCl₂ трансформируется в бактериальную клетку *E. coli*. При этом только одна клетка из тысячи будет трансформирована рДНК.

Следующий шаг – селекция, которая осуществляется в два этапа и сводится к культивированию в питательной среде вначале с тетрациклином, а затем с ампициллином. В первом случае к росту способны только те *E. coli*, которые в своем составе содержат либо рДНК, либо нативные плазмиды pBR322, а во втором – только те плазмиды pBR322, в составе которых имеется рДНК.

Вектор pUC19. Его размер составляет 2,686 н.п.; устойчив к ампициллину, содержит гены lacZ² и lacI (рис. 14.4). Ген lacZ² содержит уникальные участки для ферментов-рестриктов EcoRI, LacI, KpnI, XmaI, SmaI, BamHI, HbaI, Sall, HincII, AclI, PstI, BstI, BspMI, SphI и HindIII и используется для вставки чДНК. Плазмида содержит ген Amp, который функционирует в *E. coli*.

Для многих векторов характерны свои "изобретательные" проекты, но принцип их работы в рДНК обеспечивается двумя требованиями: выбор клонируемых сайтов и упрощенная методика выявления рекомбинантных плазмид (селекция, т.е. скрининг). Следует отметить, что сайты узнавания для рестриктов в рДНК выполняют две функции:

- 1) необходимы для вставки чДНК в клонируемый вектор;
- 2) "позволяют" чДНК "вжиться" в ДНК-вектор.

Бактериофаг λ состоит из головки и трубчатого хвоста белковой природы. Внутри головки локализована линейная молекула ДНК длиной 50 kb. При конструировании вектора ДНК извлекают из бактериофага. Воздействуют на молекулу ферментом BamHI, который разрезает ДНК на три части:

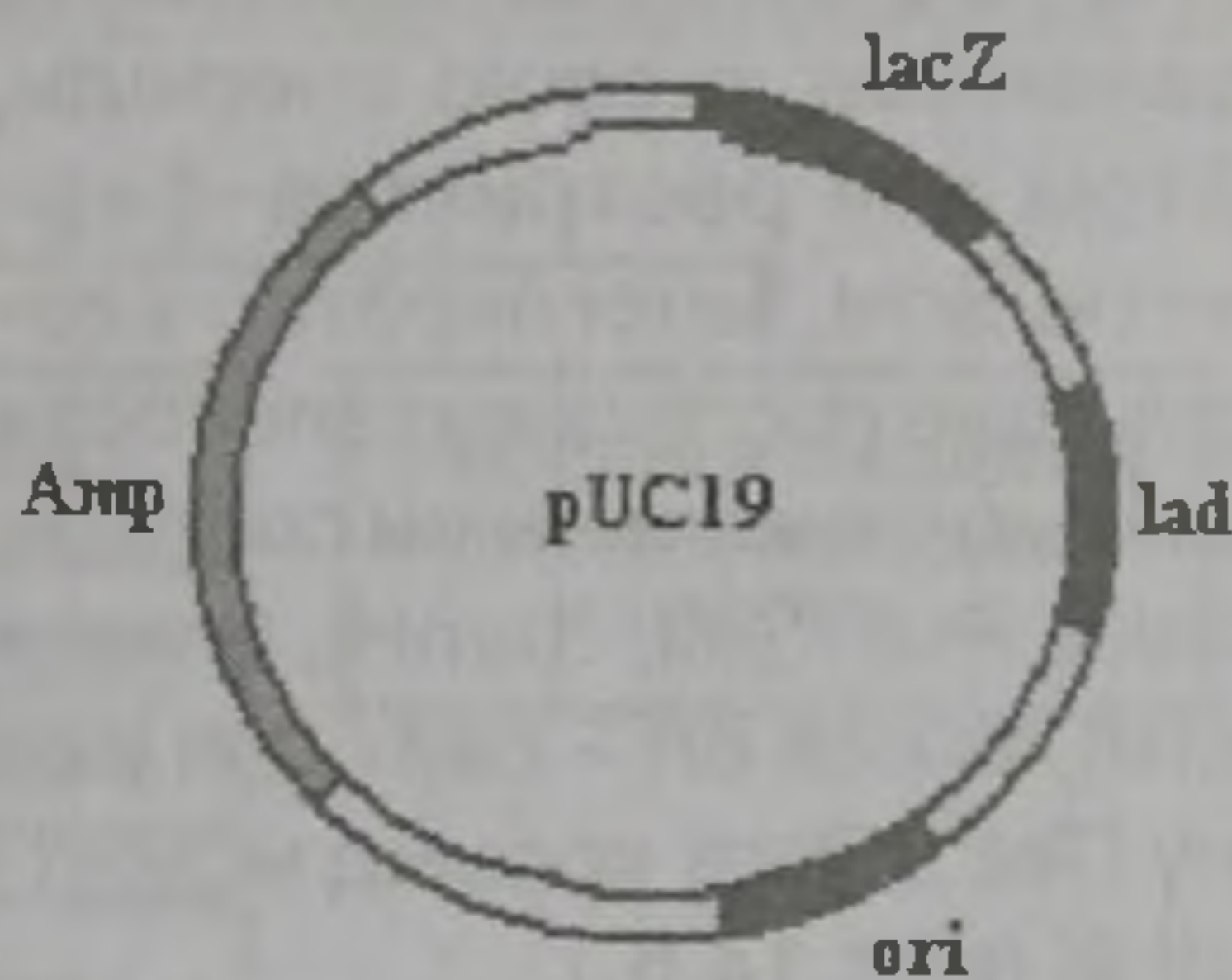


Рисунок 14.4. Упрощенная схема генетической карты вектора pUC19.

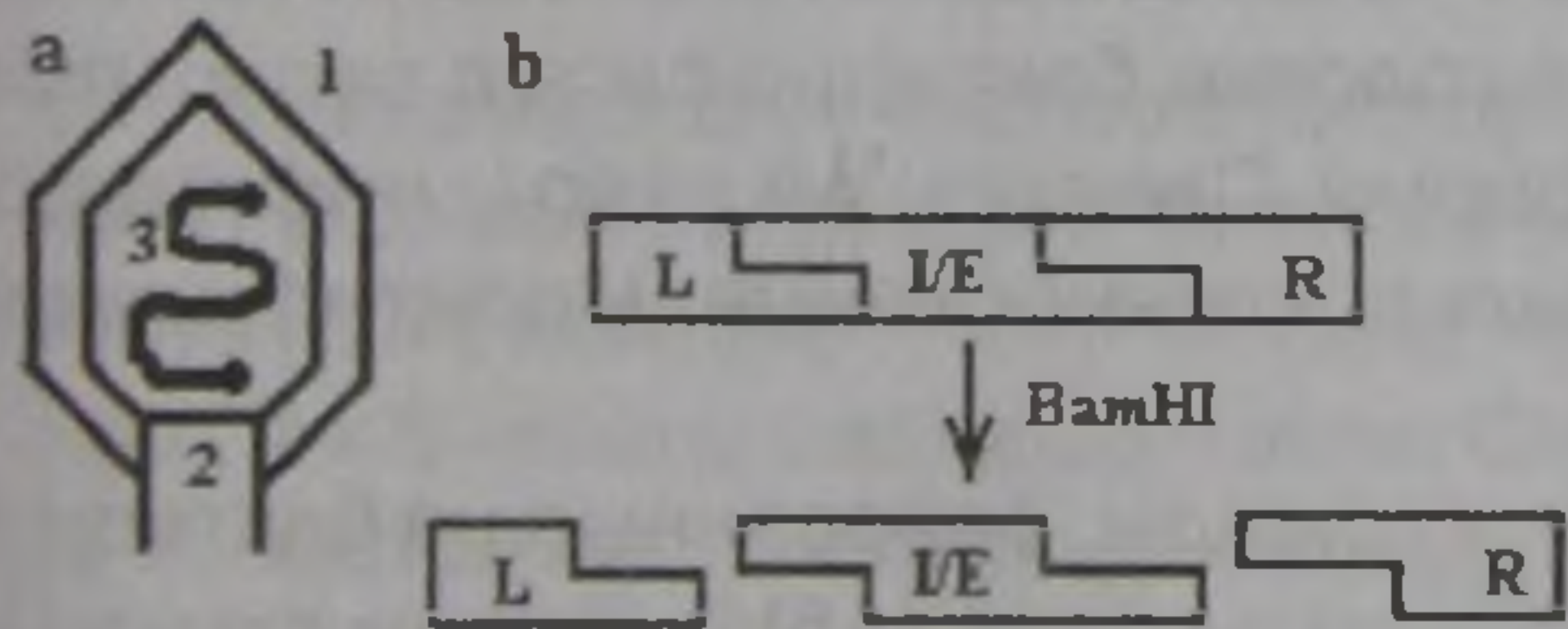


Рисунок 14.5. Бактериофаг λ – как клонирующая система: а – упрощенная схема строения; б – схема рестрикции.

L – область – в ней содержится генетическая информация, необходимая для синтеза белковой молекулы, которая формирует головку и хвост бактериофага.

R – область – в ней содержатся гены, необходимые для репликации ДНК и лизиса клетки.

I/E – область – в ней содержатся гены, необходимые для формирования колоний. Размер данного фрагмента составляет примерно 20 kb. При формировании библио-

теки генома именно эта последовательность бактериофага замещается чДНК (рис. 14.5.).

Образованный рекомбинантный вирус переносится в *E.coli*. Принцип конструирования и клонирования рДНК в целом схож с вышеизложенной методикой.

Космиды – это векторы, которые могут вместить чДНК размером до 40kb. В космидах объединены свойства плазмиды и бактериофага л.

Например, космид pLFR - 5 (приблизительно 6kb) имеет от бактериофага л два *cos* сайта, отделенные, в свою очередь, сайтом для рестрикто-ферментов *ScaI*, многократно клонирующие последовательности с шестью уникальными сайтами (*HindIII*, *PstI*, *Sall*, *BamHI*, *SmaI* и *EcoRI*), также *ori* – сайт для репликации ДНК и ген устойчивости к тетрациклину (*Tet^r*). Этот космид может вместить в себя примерно 40kb клонируемого ДНК (рис. 14.6.).

Для размещения клонируемого ДНК в этот вектор необходимо выполнить следующие процедуры. Вначале производится рестрикция ферментом *ScaI* и далее *BamHI*. Параллельно подготавливается чужеродный ген, размером 40kb, который также выделяется из ДНК с помощью фермента *BamHI*. Сшивание ДНК космида и чДНК осуществляется ферментов Т4 ДНК-лигаза. Лигирование чДНК, размером 40kb осуществляется между двумя фрагментами, длина которых в целом составляет 10kb. Следовательно, длина молекулы будет равна 50kb. После сборки в головке бактериофага л сконструированная ДНК принимает кольцевую форму. Следующий этап – инфицирование бактериальной клетки *E.coli* с целью клонирования. Идентификация осуществляется благодаря *Tet^r* – гену.

Имеются дополнительные векторы–космиды, основанные на бактериофаге л. Например, геном P1 бактериофага, размером 115kb. В этом случае P1 – космид система может вместить 85kb чДНК.

Преимущества в использовании космидов: 1) способны вместить большой объем генетической информации; 2) для создания библиотеки клонируемый космид благодаря маркерам и отсутствию двойников способен быстро идентифицироваться.

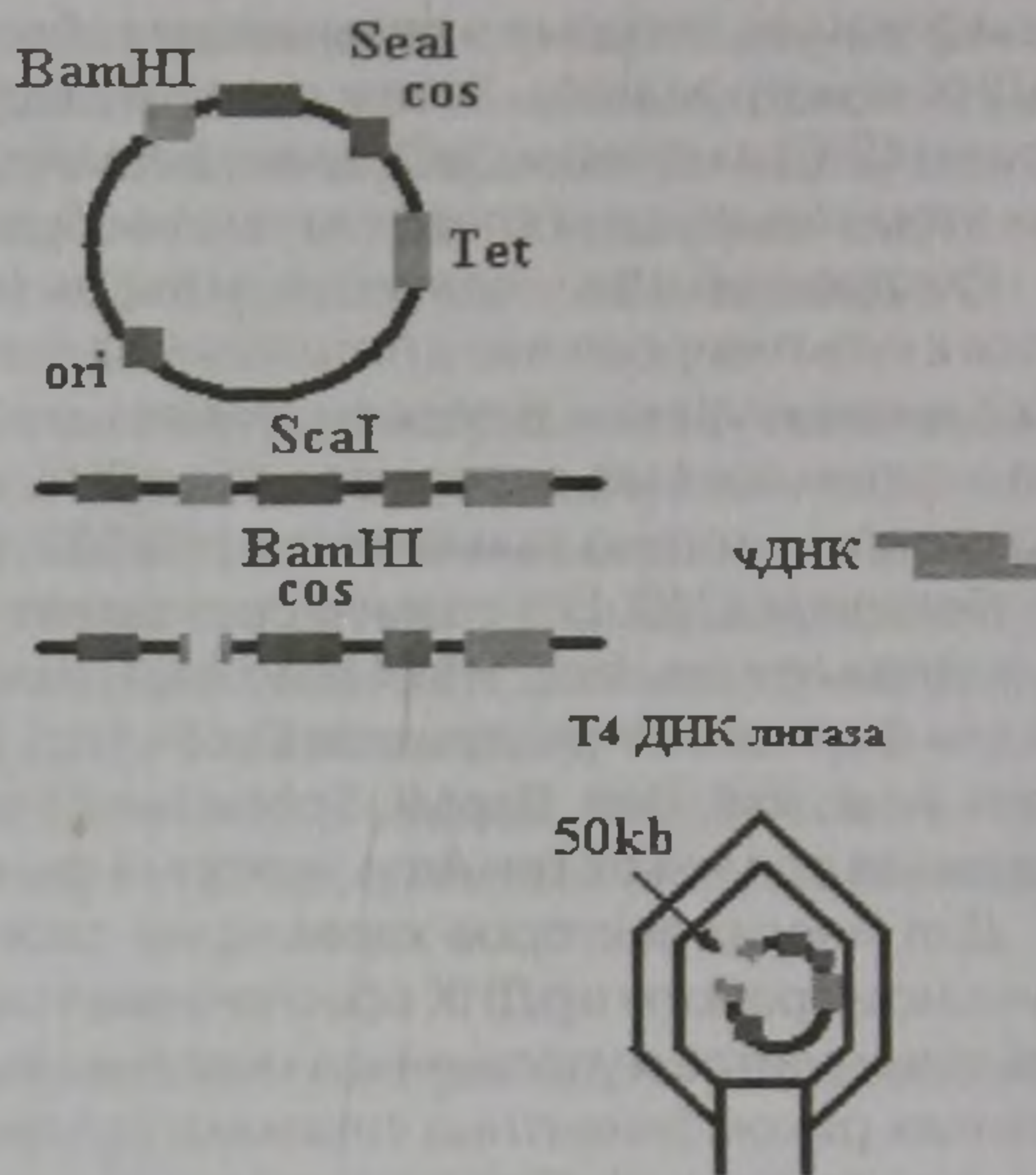


Рисунок 14.6. Космид – как клонирующая система. (разъяснение смотреть в тексте).

Векторная система, которая несет в себе большую чужеродную информацию (более 100kb) удобна для генома эукариот. Например, очень большая вставка в векторные системы является обязательным для картографии человеческого генома, открытия и обнаружения генов человека. В отличие от библиотек с малыми размерами клонируемого ДНК, библиотека с большими размерами клонируемого ДНК (100kb и более) включает весь генетический материал организма и имеет меньшее количество двойников. Так, бактериофаг вектор клонируемая система BAC_s (бактериофаг P1 + F-плазмида = космид) несет в себе ДНК-последовательность, объемом от 150 до 308kb.

14.4. Химический синтез ДНК

Механизмы, которые автоматизируют химические реакции по синтезу ДНК, превратили эту процедуру в более или менее обычную методику. Аппаратура, применяемая для синтеза ДНК, состоит из набора различных клапанов и насосов, которые, благодаря компьютерным программным разработкам, в строгой и правильной последовательности обеспечили подачу указанных нуклеотидов и реактивов, требуемых для сцепления каждого вновь поступающего нуклеотида к растущей цепи.

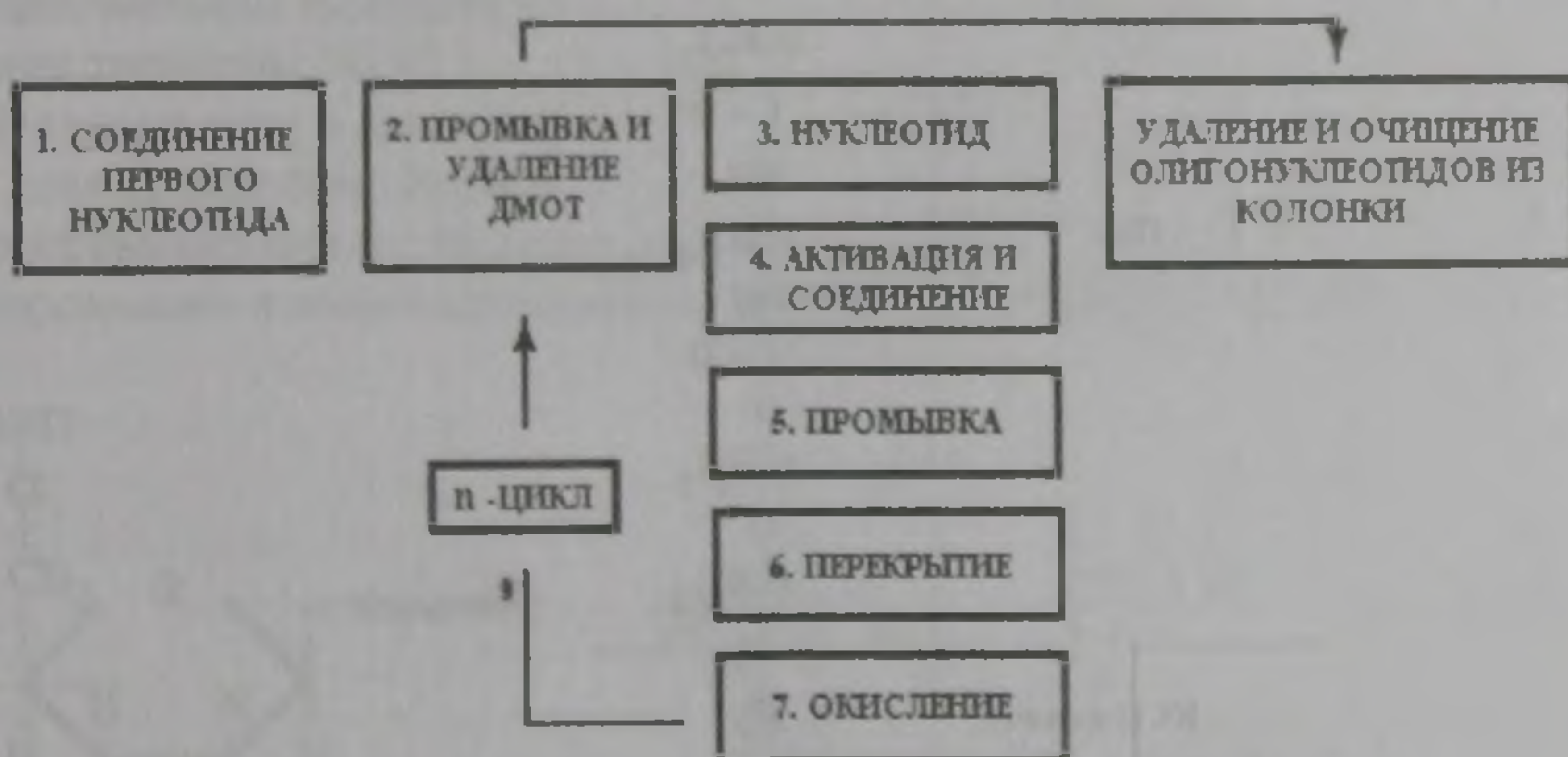


Рисунок 14.7. Общая схема химического синтеза олигонуклеотидов (осцДНК).

Важной особенностью этого процесса является то, что химический синтез ДНК *in vitro* не следует "биологическим руководствам" синтеза ДНК *in vivo*. При *in vitro* каждые поступающие нуклеотиды соединяются не к 3'-концу (*in vivo*), а к 5'-концу растущей цепи. Стандартная модель химического синтеза ДНК состоит из следующих процессов (рис. 14.7.):

1. Соединение первого нуклеотида. Первый нуклеотид "прикреплен" к инертной твердой основе (контролируемый стеклоярус с однородными по размерам порами – КСП). К 3'-концу присоединяется пространственная молекула, а к 5'-гидроксильной группе – диметокситрибутил (dimethoxytrityl-DMT; рис. 14.8.). DMT предотвращает 5'-ОН группу от любой "неопределенной" реакции перед добавлением второго нуклеотида.

При этом каждый нуклеотид, который нужно добавить к растущей цепи имеет 5 - DMT группу и дизоксипропиламиновую группу (disorpropylamine group-dsp), которая присоединена к третьему концу и защищена остатком метила (рис. 14.9.). Эта молекулярная конфигурация называется фосфорамидитом (phosphoramidite).

Таким образом, как только первый нуклеотид присоединится к КСП-капле, начинается цикл.

2. Промывка реакционной колонки и удаление DMT следующими реактивами:

1) воду и различные нуклеобазы удаляют ацетонитрилом, последний – аргонном;

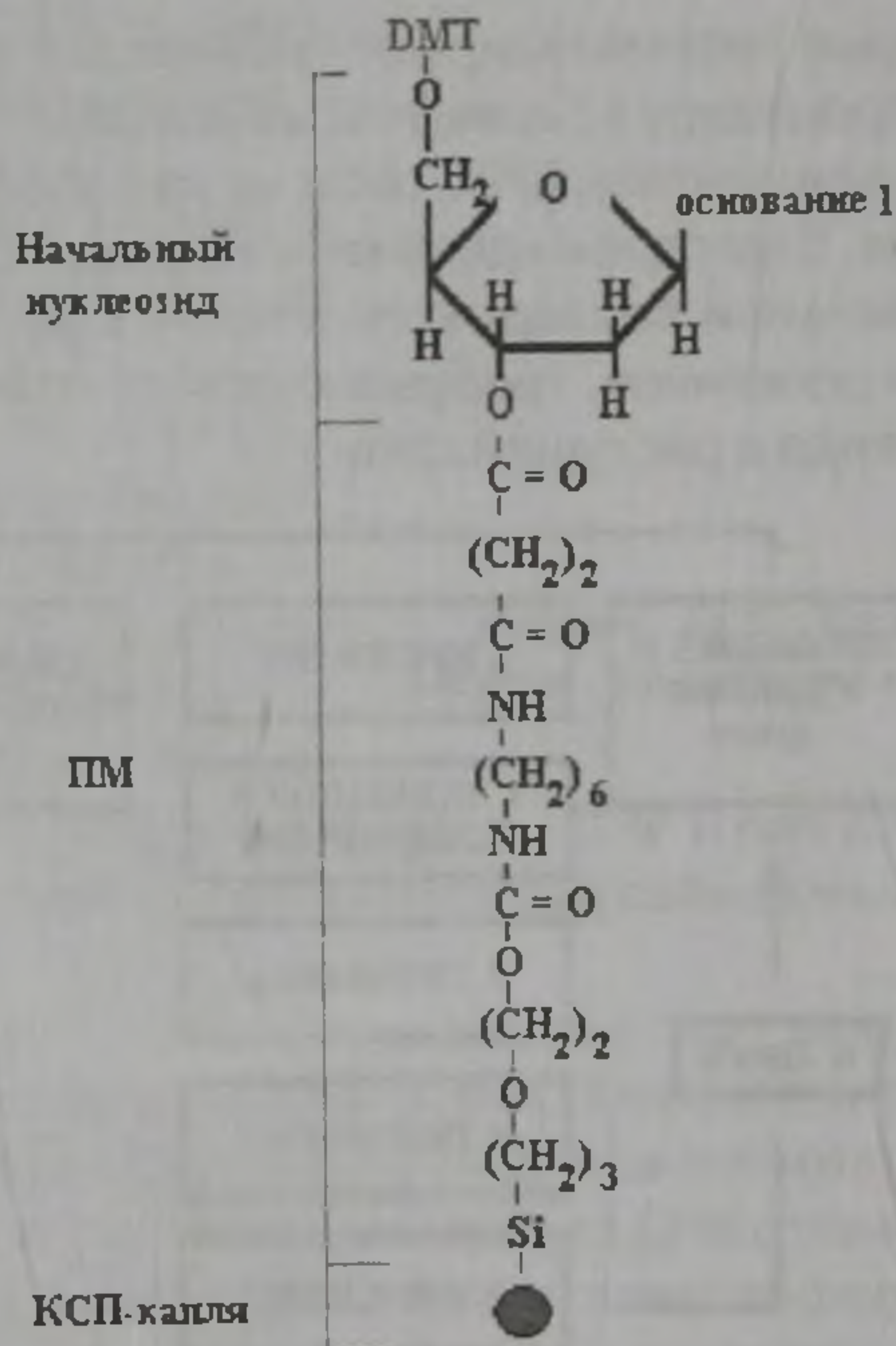


Рисунок 14.8. Стартовый комплекс для химического синтеза ДНК.

2) 5 - DMT удаляют трихлороацетиловой кислотой (ТЦК) с целью освобождения 5'-ОН (рис. 14.10.);

3) ТЦК удаляют ацетонитрилом, а последний – аргонном.

3. Механизм, обеспечивающий следующую реакцию, запрограммирован таким образом, чтобы ввести следующую предписанную основу.

4. Активация и соединение. Тетразольная активация производится для того, чтобы 3'-фосфатные формы ковалентно соединились с 5'-ОН начального нуклеозида (рис. 14.11.).

5. Промывка. Не включенные химические компоненты удаляются аргоном.

6. Перекрытие. Не все основания связываются в звено с нуклеотидами при первой реакции сцепления, поэтому остатки будут мешать вновь поступающим нуклеотидам во время последующих циклов. Для предотвращения нежелательных "связей" желательнее одеть "сар" на 5'-ОН. Если проигнорировать этот процесс, то в дальнейшем, синтезируемые цепи одной молекулы будут отличаться между собой по длине и нуклеотидному составу.

7. Окисление. На этой связи межнуклеотидное звено находится в форме трифосфатной связи. Эта связь является не-постоянной и легко подвергается разрыву в присутствии кислоты или основания. Поэтому фосфатный триэстер окисляют смесью йода для формирования более устойчивого пентавалентного фосфатного триэстера (рис. 14.12.).

Первый шаг в синтезе ДНК завершается. Далее запрограммировано следуют следующие шаги, которые начинаются со стадии промывки и заканчиваются стадией окисления (рис. 14.6.).

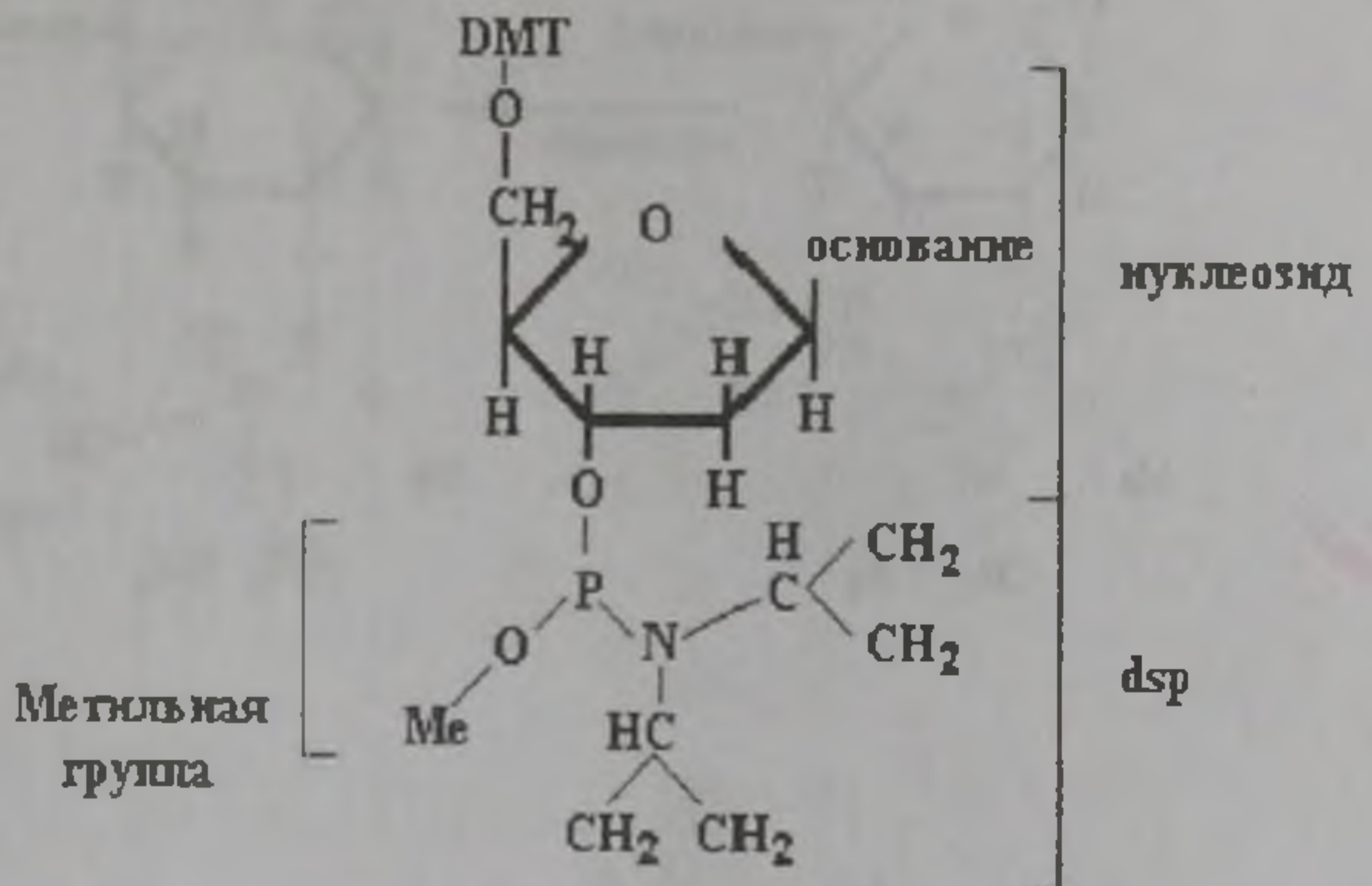


Рисунок 14.9. Структура фосфорамидита.

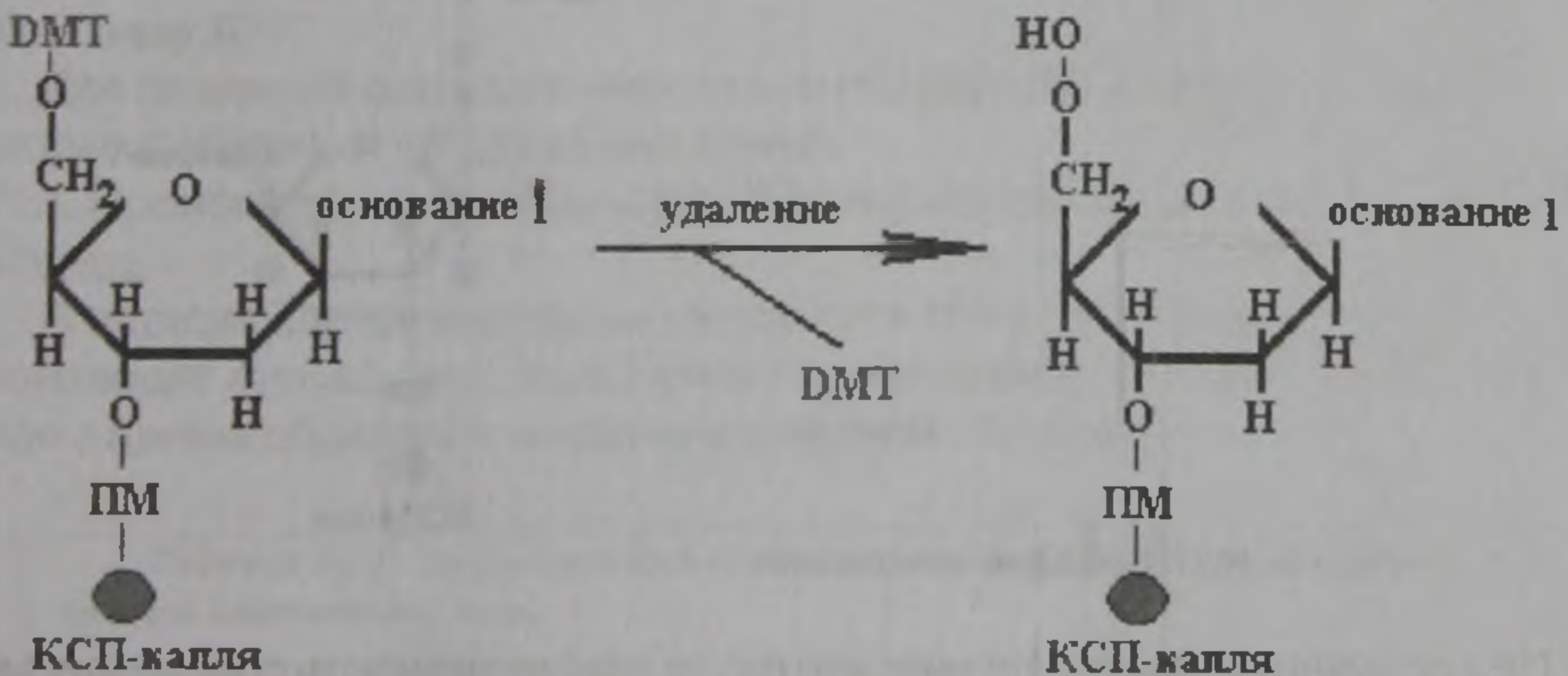


Рисунок 14.10. Схема, указывающая на удаление DMT с помощью ТЦК.

Цикл этот продолжается до тех пор, пока последний запрограммированный остаток не добавится к растущей цепи. После чего, новая синтезированная цепь граничит с КСП - каплей. При этом каждый фосфатный триэстер содержит в себе метильную группу, каждый гуанин, цитозин и аденин несут защищенную аминогруппу, а 5'-конец последнего нуклеотида имеет DMT-группу.

Реакционная колонка обрабатывается химическим путем для удаления метильных групп. 5'-конец оц-ДНК фосфорилируется ферментом *T4* полинуклеотид кеназой. После чего полученный олигонуклеотид элиминируется из колонки. Таким образом, олигонуклеотиды представляют собой фрагменты одноцепочечной ДНК, содержащие в себе от 6 до 100 нуклеотидов.

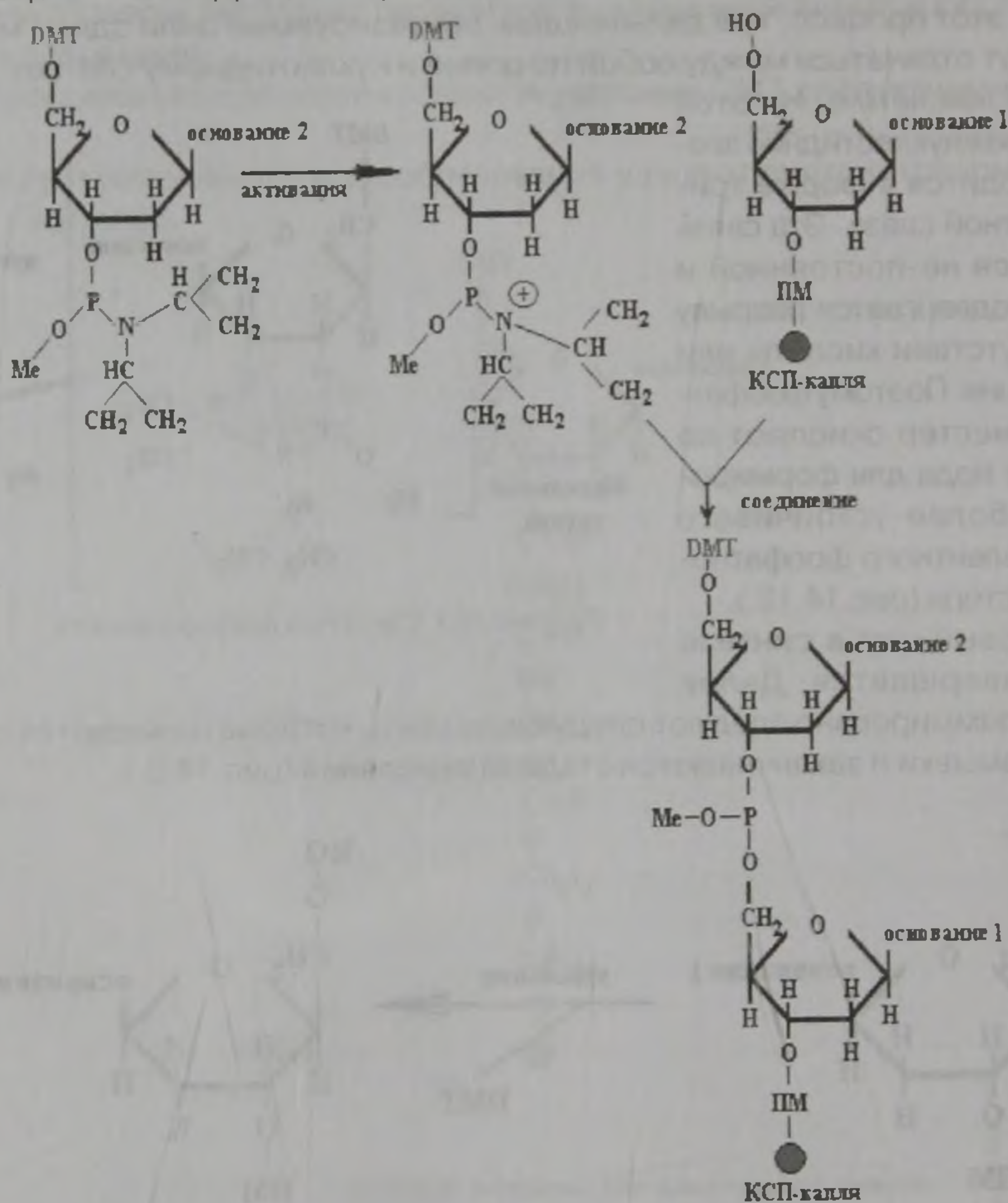


Рисунок 14.11. Активация и соединение.

При получении таких олигонуклеотидов эффективность сцепления между нуклеотидами для каждого шага не должна быть меньше 98%. Эффективность сцепления для каждого цикла определяется спектрофотометрией. Например, эффективность сцепления для каждого цикла составляет 99% при синтезе олигонуклеотидов с 20 нуклеотидами (20-mer), то 82% ($0,99^{20} \times 100$) из всех полученных олигонуклеотидов будут содержать в себе 20 нуклеотидов (табл. 14.2.). В целом же, исследователи соблюдают полезные действия сцепления приблизительно на 95-97%.

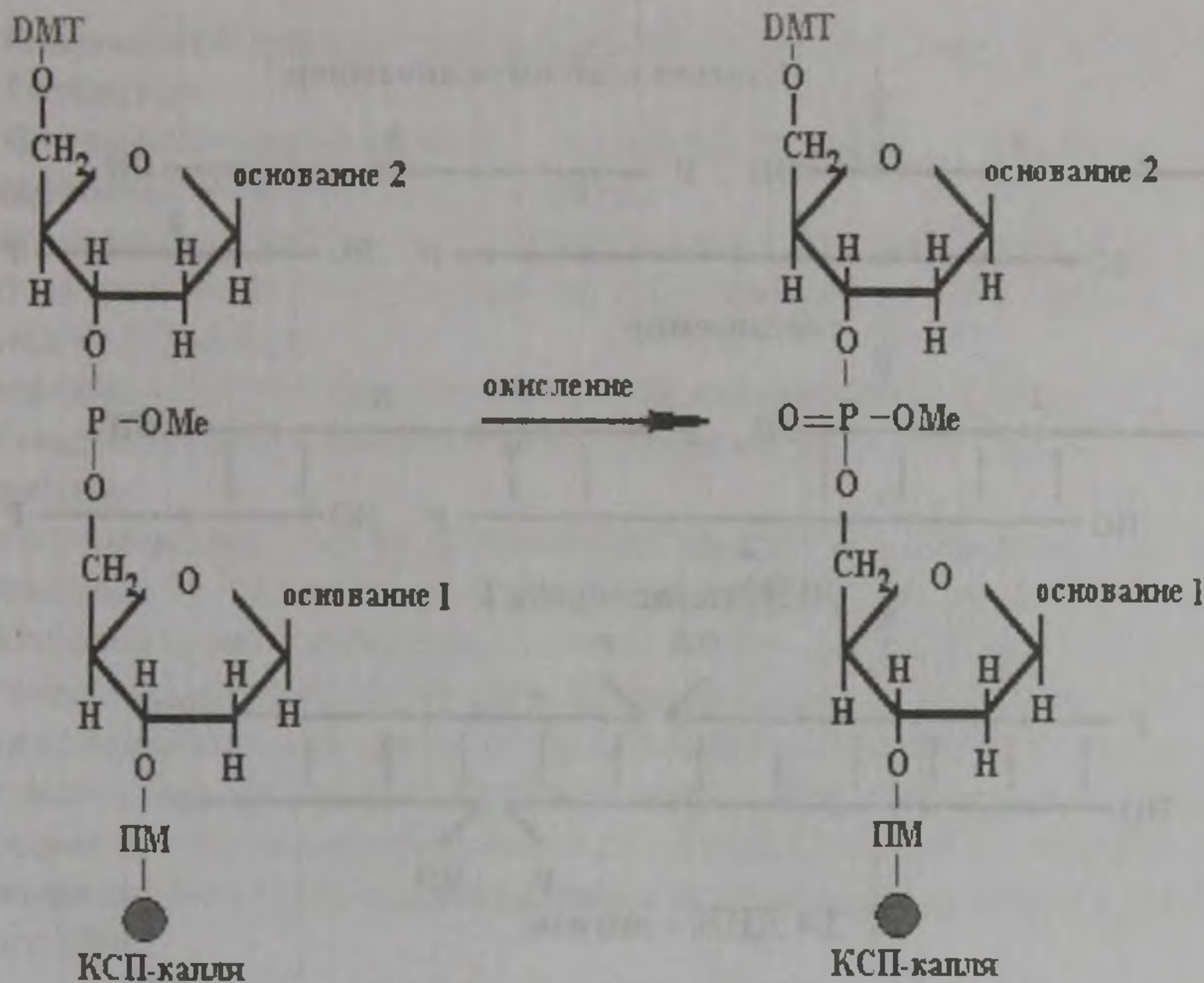


Рисунок 14.12. Окисление.

Олигонуклеотиды в молекулярной биотехнологии имеют множество применений. С их помощью можно создать целые гены или его фрагменты, ввести определенные мутации в изолированные ДНК-молекулы, создать рекомбинантные ДНК.

Для создания определенного гена разработаны методики, применение которых зависит от создаваемого гена:

1. Производство коротких (60 - 80 н.п.) и средних (более 300 н.п.) по длине генов.

В первом случае методика сводится к тому, что в реакционной колонке производят синтез двух комплементарных цепей, которые затем соединяются с целью образования двухцепочечной структуры.

Таблица 14.2. Эффективность сцепления для каждого цикла при химическом синтезе олигонуклеотидов

Эффективность сцепления	Общее количество произведенных олигонуклеотидов				
	20-мер	40-мер	60-мер	80-мер	100-мер
90	12	1,5	0,18	0,02	0,003
95	36	13	4,6	1,7	0,6
98	67	45	30	20	13
99	82	67	55	45	37
99,5	90	82	74	67	61

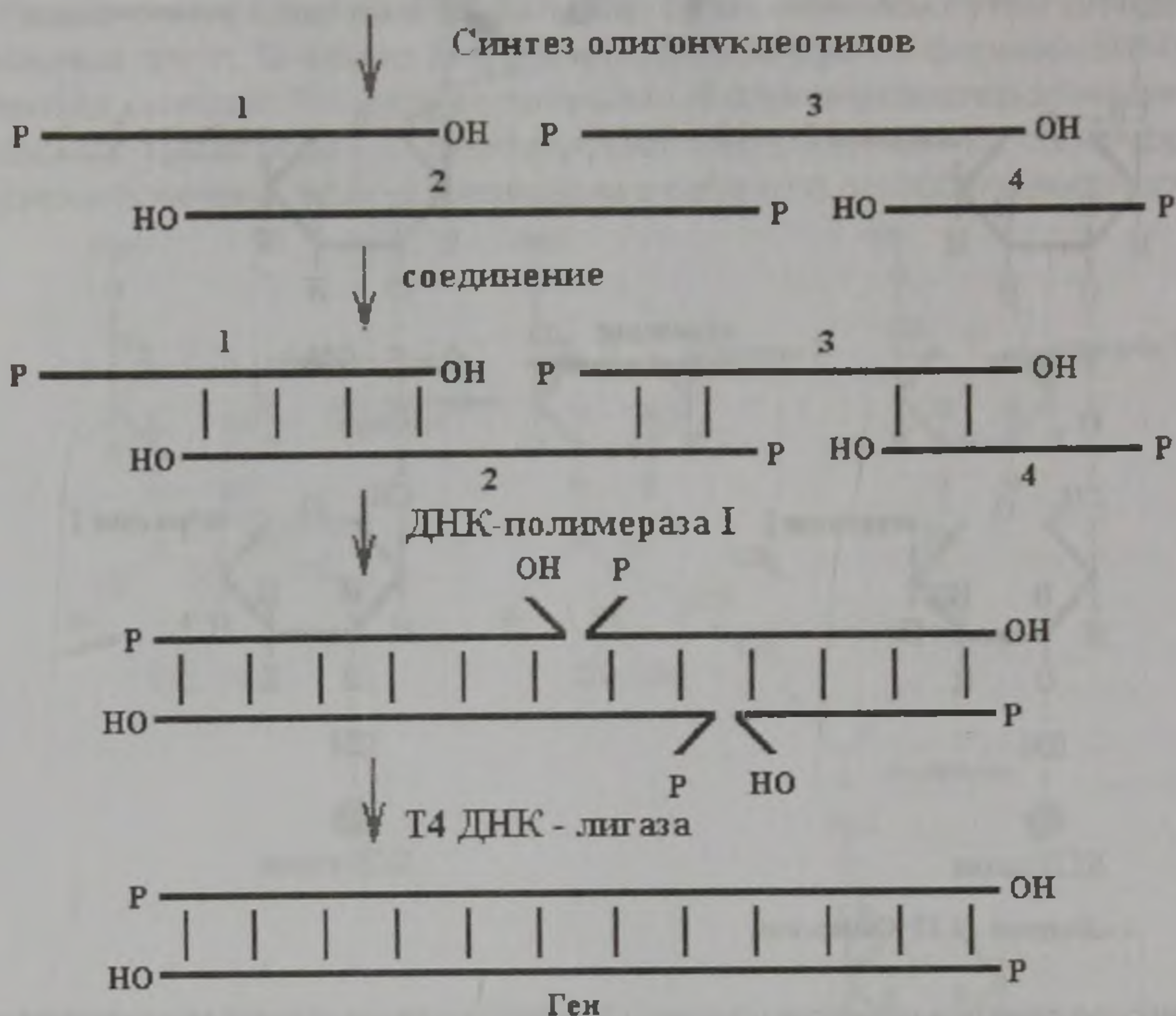


Рисунок 14.13. Общая схема синтеза гена.

Во втором случае необходимо, вначале синтезировать олигонуклеотиды (40 - 100 нуклеотидов), которые затем соединяются для образования двухцепочечной молекулы. Полученные таким образом молекулы имеют большие пробелы, которые "закрываются" под действием фермента *E. coli* ДНК-полимераза I. Этот фермент использует свободный 3'-конец как затравку (6 - 10 нуклеотидов). После чего T4 ДНК-лигаза сшивает концы, образуя ген (рис. 14.13.).

2. Производство больших (1 Mb и более) генов. В этом случае ген собирается из двухцепочечных фрагментов (20-60 н.п. каждая). Особенность этой методики заключается в том, что секвенированию сначала подвергаются двухцепочечные фрагменты, а затем – полученный ген.

14.5. Секвенирование ДНК

Молекула ДНК выражает себя через нуклеотидную последовательность. Поэтому нуклеотидная информационная последовательность существенна при молекулярном клонировании. Методы, способствующие определению нуклеотидной последовательности ДНК, называют секвенированием. Для секвенирования ДНК применяют методы, различающиеся по способам выделения исходного набора фрагментов и радиоактивного мечения:

1. Химический анализ – первоначально развит Аланом Максамом и Уолтером Гилбертом.

2. Ферментативный анализ – развитый Фредом Санджером и названный дидезоксинуклеотидным методом.

Методика, разработанная А. Максамом и М. Гилбертом, рассматривается во многих литературных источниках, поэтому здесь вкратце изложена методика Ф.Санджера.

Дидезоксинуклеотид – это молекула, созданная *in vitro*, и которая испытывает недостаток в гидроксильной группе на обоих 2'- и 3'-углеродах дезоксирибозы.

Естественная молекула дезоксирибонуклеотид имеет 3'-ОН на дезоксирибозе (рис. 14.14,а). В период ДНК-репликации, поступающий естественный нуклеозид трифосфат связывается 5'-фосфатной группой к 3'-ОН последнего нуклеотида растущей цепи. Если же дидезоксирибонуклеотид включается в конец растущей цепи, то ДНК-синтез останавливается, так как фосфоэфирная связь не может сформировать соединение со следующим поступающим нуклеотидом (рис. 14.14,б). Завершение синтеза ДНК – наиболее важная особенность секвенирования с помощью дидезоксирибонуклеотидного ДНК.

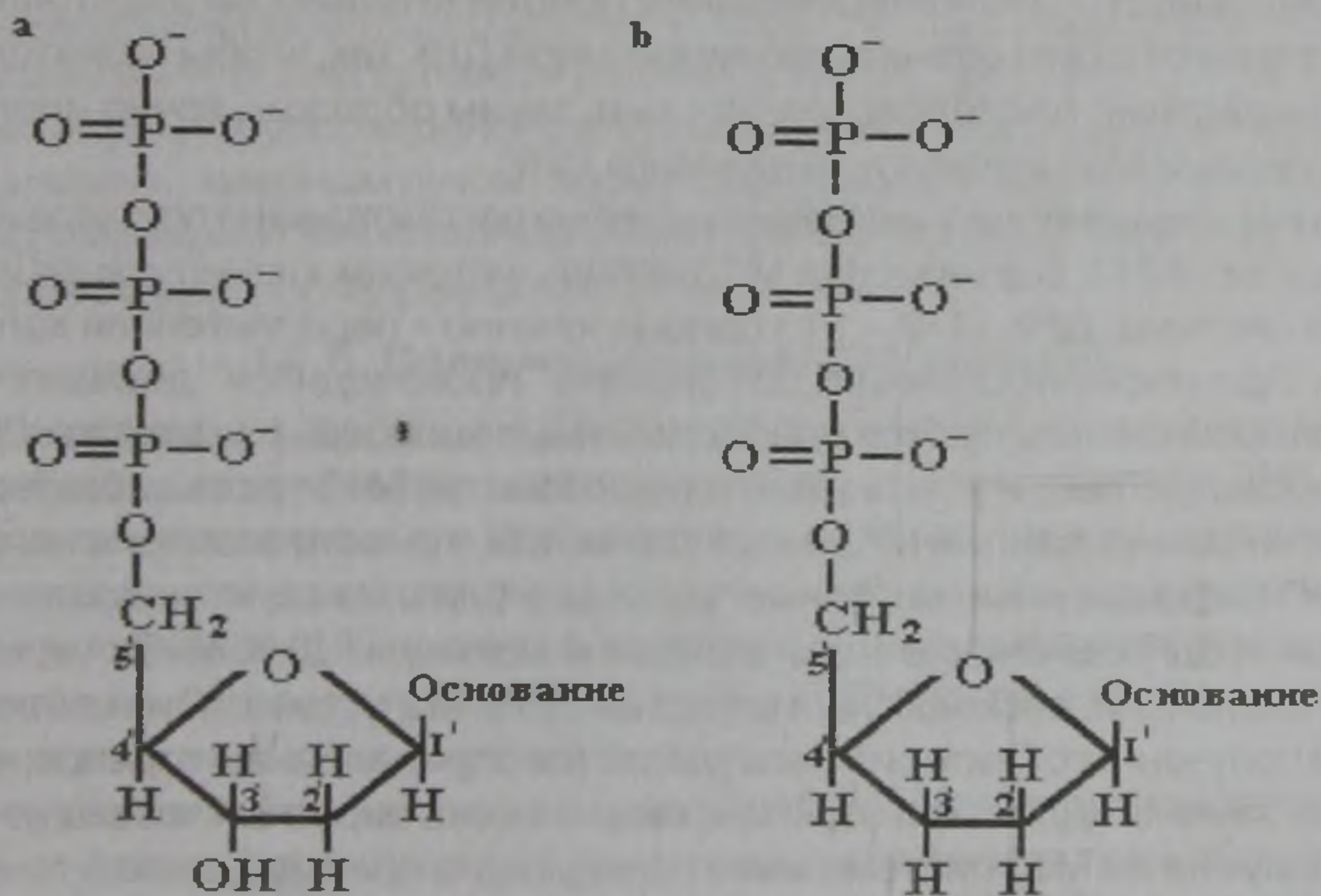


Рисунок 14.14. Дезоксирибонуклеотид (а) и дидезоксинуклеотид (б).

В лабораторных исследованиях при использовании для секвенирования дидезоксирибонуклеотидного метода процедура начинается с отжига синтетического олигонуклеотида (17 - 24 мер) к predeterminedенной доле цепи клонирующего вектора около сайта вставки клонированной ДНК. В этом случае, олигонуклеотид действует как "букварь" - последовательность, обеспечивая

32-ОН для инициирования синтеза ДНК. При этом образцы ДНК разделяются на четыре реакционных трубок, каждая из которых содержит по четыре дезоксирибонуклеотида (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), один из которых радиоактивно помечен и по одному из четырех дидезоксирибонуклеотида (ddATP, ddCTP, ddGTP, ddTTP). Концентрация каждого дидезоксирибонуклеотида в каждой реакционной трубке устанавливается благодаря программному обеспечению, чтобы гарантировать безошибочное включение в смесь растущих цепей на каждом сайте. Поэтому после ферментативного синтеза ДНК, каждая реакционная трубка будет содержать уникальные наборы олигонуклеотидов, при этом каждый полученный олигонуклеотид включает последовательность "букваря". Синтез останавливается по "команде", когда соединяется к растущей цепи один из четырех дидезоксирибонуклеотидов и ДНК молекула отделяется от электрофореза в полиакриламидном геле. Авторадиограмма геля показывает фрагменты, которые были произведены в течение ферментативной стадии синтеза ДНК. Последовательность клонируемой ДНК фиксируется на рентгеновской пленке благодаря радиоактивной метке. На радиоавтографии образуются четыре группы фрагментов, при этом каждый фрагмент имеет определенную длину и оканчивается одним из четырех дидезоксирибонуклеотидов. Полосы читаются автордиографией от основания к вершине. Вначале очень быстро фракционирует наименьший фрагмент ДНК, а в конце – наибольший. Обычно последовательность шаблона помещена приблизительно на расстоянии 10-20 нуклеотидов от сайта вставки клонированной ДНК так, чтобы "искатель" мог признать известную последовательность и, таким образом, точно идентифицировать первый нуклеотид клонируемого ДНК.

Принципы секвенирования более подробно рассмотрим на примере использования вектора M13. Бактериофаг M13 используется как клонирующая и секвенирующая система. ДНК M13 – это одноцепочечно - переплетенная кольцевая молекула. При инфицировании *E. coli* сначала "производится" двухцепочечная ДНК, от которой синтезируются одноцепочечные кольцевые молекулы ДНК, которые, в последующем, и упаковываются в потомстве M13 частицы бактериофага. Клетки, инфицированные M13, не разлагаются, а вместо этого они непрерывно "прячут" инфекционные вирусные частицы в близлежащее окружение. Каждый из новых одноцепочечно-переплетенной молекулы ДНК M13 покрывается белочной оболочкой, поскольку эта вирусная ДНК "выпускается" из клетки *E. coli*. От генома полученного бактериофага удаляется определенный отрезок, необходимый для замены чДНК. При этом инфекционность вирусных частиц не разрушается. Полученная M13 система имеет следующие преимущества:

1) репликативная форма может быть использована для конструирования рДНК и его клонирования (длина чДНК не превышает 500 н.п), в этом случае чДНК вставляется в сайт, который расположен рядом с *lacZ2* геном;

2) одноцепочечно-переплетенная ДНК фага может использоваться как шаблон для ДНК-секвенирования.

Полученным вектором инфицируется *E. coli*, последние культивируются в среде, содержащей X-Gal субстрат, затем при гидролизации образуются две колонии: бесцветные – представленные клонируемыми векторами и голубые – это

преобразованные M13 бактериофаги, сохранившие функциональную последовательность *lac Z2* гена и поэтому не содержащие чДНК. Бактериофаги от бесцветной колонии изолируются и используются для секвенирования оц-ДНК.

При клонировании ДНК больших размеров (более 2000 п.н.) применяют обычную плазмиду, затем с помощью эндонуклеаз определяют рестрикционную карту. Полученные рестрикты, не превышающие 100 - 500 н.п. вставляются в M13 вектор и далее подвергаются секвенированию.

Для секвенирования ДНК, длина которого превышает 5000 н.п. применять систему M13 затруднительно, так как требуется большое число подклонирующих шагов и векторов. Данное неудобство при секвенировании было преодолено другой методикой, названной "шаблоновые тропы". Суть этой методики сводится, вкратце, к следующему: ДНК-плазмиды с чДНК "очищаются" и подвергаются отжигу синтетическим олигонуклеотидом, которые основывают пары с одним из цепей вектора около сайта вставки клонированной ДНК до тех пор, пока не образует пару с дидезоксирибонуклеотидом. Таким образом определяется последовательность 250 - 350 нуклеотидов ДНК. На основе этого анализа олигонуклеотидные шаблоны определяют последовательность клонируемой ДНК сегментами. При этом длина каждого шаблона составляет приблизительно 24 нуклеотида. Для этой процедуры применяются векторы, в которых вставлены чДНК от 20 kb (бактериофаги) до 40 kb (космиды).

Процедуры, связанные с секвенированием полностью автоматизированы. В них шаблоны помечены флуоресцентными маркерами, которые испускают различные длины волн. В этих автоматизированных системах, содержание всех четырех реакционных труб объединено и подвергнуто электрофорезному гелю. Ряд просматривается лазерным лучом, порядок флуоресцентных ответов регистрируется программным компьютерным обеспечением, который сопоставляет данные и распечатывает последовательности нуклеотидов.

14.6. Полимеразная цепная реакция

Полимеразная цепная реакция (ПЦР) – это эффективная процедура для производства большого количества определенной последовательности ДНК *in vitro*. Требования, предъявляемые для ПЦР, сводятся к наличию следующих химических компонентов: синтетические олигонуклеотидные шаблоны (по 20 нуклеотидов каждый), теплоустойчивая ДНК-полимераза, четыре дезоксирибонуклеотида.

Каждый шаг и температурные изменения в ПЦР программно автоматизированы. Один цикл, в среднем, длится 3-5 минут.

ПЦР – это цикловый процесс, осуществляется благодаря трехступенчатому шагу:

1. Денатурация. Первый шаг в ПЦР – это тепловая денатурация образца ДНК. При этом температура в реакционной трубе достигает 95°C. Реакционная труба содержит огромный молярный избыток двух олигонуклеотидных шаблонов, теплоустойчивую ДНК-полимеразу (например, Таг ДНК-полимераза, изолированная от бактерии *Thermus aquaticus*) и четыре дезоксирибонуклеотидов. Высокая температура удерживается приблизительно около одной минуты.

2. Ренатурация. При втором шаге температура смеси медленно охлаждается до 55°C. В течение этого шага шаблоны образуют пары с последовательностями исходной ДНК.

3. Синтез. В третьем шаге температура поднята до 75°C, которая является оптимальной для функционирования Tag ДНК-полимеразы. Синтез ДНК начинается с 32-конца каждого шаблона.

При этом общий принцип синтеза каждого цикла сводится к следующим этапам:

1. чДНК находится между последовательностями двух цепей. Два шаблона смешаны с типовой ДНК. Смесь, содержащая в своем составе все необходимое для синтеза (ДНК-полимераза, четыре типа дезоксирибонуклеотидов) и денатурации, нагревается до 95°C, а затем медленно охлаждается до 55°C. При этом шаблоны олигонуклеотидов образуют связь с чДНК и, при поднятии температуры до 75°C начинается синтез комплементарной цепи ДНК от 32-конца шаблона и продолжается вдоль цепи одноцепочечной чДНК. Новые синтезируемые цепи называются "длинные шаблоны" и они будут использоваться во втором цикле.

2. Первоначальные цепи ДНК и "длинные шаблоны" также подвергаются денатурации по вышеизложенным принципам. При ренатурации шаблоны скрещиваются с дополнительными первоначальными ДНК и "длинными шаблонами". При ферментативном синтезе ДНК от первоначальных цепей синтезируются "длинные шаблоны", а от "длинных шаблонов" первого цикла - "короткие шаблоны".

3. В течение третьего цикла уже используются ДНК трех типов: оригинал, т.е. первичная молекула ДНК, "длинные шаблоны" и "короткие шаблоны".

ПЦР – это распространенная в молекулярной биотехнологии процедура, которую применяют при идентификации патогенного гена в организме человека, животных и растений, для обнаружения спонтанных мутаций, конструирования целых генов от синтетических олигонуклеотидов, а также для ДНК -секвенирования.

14.7. Рекомбинантный белок

Экспрессия – самовыражение гена, которая проявляется через транскрипцию и трансляцию. Для экспрессии рекомбинантного гена необходимым условием является его интеграция. Интеграция – это включение молекулы чДНК в хромосомный сайт.

Экспрессия рДНК в клетках прокариот. Успешная экспрессия (выражение) клонируемых генов зависит от природы транскрипционных промоторов и терминаторов, силы рибосомных связывающих сайтов, числа копий клонируемого гена (входит ли ген в состав плазмиды или он интегрировался в геном бактерии), эффективности трансляции и стабильности клонируемых генов в пределах клетки.

На сегодняшний день нет определенных принципов, чтобы достичь максимальной экспрессии клонируемого гена. Клонированные в клетках прокариот гены имеют широкий диапазон применения. Наиболее простым и быстрым способом для производства рекомбинантных белков на уровне прокариот послужили "идеальные" в биотехнологическом плане организмы, а

именно *E. coli*. Стратегии, которые были разработаны для *E. coli*, в целом, могут быть применены ко всем системам.

Для экспрессии гена одним из требований является присутствие сильного промотора. Сильный промотор – это тот, который имеет высокую специфичность для РНК-полимеразы. Способность регулировать промотором позволяет управлять степенью транскрипции. А это наталкивает ученых на возможность оптимизирования экспрессии клонируемого гена при сильном промоторе, который обеспечит непрерывную расшифровку. Однако, высокий уровень непрерывной экспрессии из клонированного гена часто вреден для клеток прокариот, потому что сопровождается большими затратами энергии и, в итоге, клетка “теряет” собственную функциональную особенность. Кроме того, сконструированная плазмида после нескольких циклов делений может быть “потеряна”. Такая плазмидная нестабильность является главной проблемой, но она может быть предотвращена при использовании сильного регуляторного промотора, которая управляет транскрипцией так, что ген “включается” лишь в определенной стадии развития клетки и “работает” в указанной продолжительности. Плазмиды, построенные для выполнения этих задач, называют векторами экспрессии.

Наиболее широко используемые регуляторные промоторы, получены от *E. coli* – это *lac* (лактоза) и *trp* (триптофан) опероны и *tac*-промотор, расположенный на расстоянии -10 н.п. от сайта инициации *lac* промотора по направлению к 52-концу и 35 н.п. от *trp* промотора. Каждый из этих промоторов взаимодействует с генами-репрессорами, которые обеспечивают управляемое “включение” или “выключение” определенной транскрипции смежных клонированных генов. Кроме того, каждый из этих промоторов признан главной формой для *E. coli* РНК-полимеразы, который использует фактор сигмы (белок, ответственный за направление синтеза на ДНК). Так, в отсутствие лактозы в питательной среде *E. coli* *lac* промотор “выключен” благодаря белку *lac* гена-репрессора, который предотвращает *lac* оперон от расшифровки. Индукция *lac* промотора достигается при добавлении лактозы. Следовательно, в этом случае лактоза – это индуктор транскрипции, который препятствует *lac* гену репрессору связаться с *lac* оператором и, иницируя, таким образом, транскрипцию.

Резюме

Как Вы убедились, в настоящее время молекула, получаемая человеком в условиях *in vitro* и названная рекомбинантной ДНК, нашло широкое применение во всех сферах деятельности человека, начиная от молекулярных исследований (биотехнология микроорганизмов), заканчивая – экологически и, следовательно, космическими.

Рекомбинантную ДНК применяют в медицине в борьбе с инфекционными болезнями, для устранения наследственных нарушений, при диагностике. В животноводстве рекомбинантная ДНК необходима для увеличения продуктивных качеств животных, повышения их резистентности. И эти преиму-

щества можно продолжать до "бесконечности". Поэтому изучение вопросов, связанных с получением, конструированием и клонированием рекомбинантных молекул актуально с точки зрения профессиональных потребностей.

Содержание излагаемой главы упрощено до максимума. В главе не описываются все методики и приемы, которые применяются для получения (метод вырезания, химический и химико-ферментативный синтез гена) и секвенирования гена (чДНК), конструирования и клонирования рДНК. Для более глубокого и разностороннего изучения, заинтересованному читателю необходимо обратиться к дополнительным источникам.

Ключевые слова и понятия:

Аmplификация	Полимеразная цепная реакция
Банк гена	Рекомбинантная ДНК
Библиотека генома	Рекомбинантный белок
Вектор. плазида	Секвенирование
Дезоксирибонуклеотид	Скрининг
Дидезоксирибонуклеотид	Фаг
"Длинные шаблоны"	Ферменты-лигазы
Конструирование рДНК	Ферменты-полимеразы
"Короткие шаблоны"	Ферменты-рестрикты
Космид	Химический синтез гена
Олигонуклеотиды	

Контрольные вопросы:

1. Что собой представляет молекула рДНК?
2. Какие "инструменты" используются в молекулярной биотехнологии при конструировании рДНК?
3. Для каких целей применяют ферменты?
4. Какие типы векторов применяют в молекулярной биотехнологии?
5. Какие правила нужно соблюдать при отборе вектора?
6. Какими свойствами должен обладать вектор?
7. Какие принципы нужно соблюдать при конструировании рДНК?
8. Какую функцию выполняет чДНК, а какую – вектор?
9. Следует ли химический синтез ДНК "биологическим руководствам" репликации?
10. Охарактеризовать общую схему химического синтеза ДНК.
11. Каким образом останавливается синтезируемая растущая цепь при *in vitro*?
12. Чем отличается дезоксирибонуклеотид от дидезоксирибонуклеотида?
13. Что понимают под терминами «скрининг» и «секвенирование»?
14. Для каких целей проводят секвенирование?
15. Как используется бактериофаг для секвенирования клонируемого фрагмента ДНК?

16. Что подразумевают под понятиями «банк гена» и «библиотека генома»?

17. Какая разница между такими понятиями как олигонуклеотид, чДНК, рДНК и вектор?

18. ПЦР: область применения и значение.

19. Что собой представляют «длинные шаблоны» и «короткие шаблоны»?

20. Какими преимуществами обладает метод технологии рекомбинантной ДНК для биологии, животноводства и медицины?

Рекомендуемая литература. Для более глубокого изучения тем, которые изложены в этой главе, необходимо обратиться к другим источникам. Следует отметить, что хорошую информацию Вы найдете из зарубежных источников. Вопросы, касающиеся этой главы, очень хорошо и подробно изложены в следующих работах:

1. Глик Б., Пастернак Дж. Молекулярная биотехнология. Принципы и применения. М., Мир, 2002.

2. Amemiya C. T., J. Games, P. M. Kroisel, H. Shizuya, C. Chen, M. A. Batzer, and P. J. de Jong. 1994. A new bacteriophage-derived vector for the propagation of large human DNA fragments. *Nat. Genet.* 6:84-89.

3. Berger, S. L., and A. R. Kimmel (ed.). 1987. *Methods in Enzymology*, vol. 152. *Guide to Molecular Cloning Techniques*. Academic Press, London, United Kingdom.

4. Chen, E. Y., and P. H. Seeburg. 1985. Supercoil sequencing: a fast and simple method for sequencing plasmid DNA. *DNA* 4:165-170.

5. Climie, S., and D. V. Santi. 1990. Chemical synthesis of the thymidylate synthase gene. *USA* 87:633-637.

6. Di Donato, A., M. de Nigris, N. Russo, S. Di Biase, and G. D'Alessio. 1993. A method for synthesizing genes and cDNAs by the polymerase chain reaction.

7. Fox, D. K., B. Westfall, M. Nathan, A. J. Hughes, Jr., A. Rashtchian, and D. M. Schuster. 1996. Striding new distances with 5' RACE: long 5' RACE of human APC and TSC-2 CDNA. *Focus* 18:33-37.

8. Garfin, D. E. 1995. Electrophoretic methods, p. 53-109. In J. A. Glasel and M. P. Deutscher (ed.), *Introduction to Biophysical Methods for Protein and Nucleic Acid Research*. Academic Press, San Diego, Calif.

9. Grinstead, J., and P. M. Bennett (ed.). 1988. *Methods in Microbiology*, vol. 21. *Plasmid Technology*. Academic Press, London, United Kingdom.

10. Itakura, K., J. J. Rossi, and R. B. Wallace. 1984. Synthesis and use of synthetic oligonucleotides. *Biochem*, 323-356.

11. Kirn, U.-J., B. W. Birren, T. Slepak, V. Mancino, C. Boysen, H.-L. Kang, M. I. Simon, and H. Shizuya. 1996. Construction and characterization of a human bacterial artificial chromosome library. *Genomics* 34:213-218.

12. Leonardo, E. D., and J. M. Sedivy. 1990. A new vector for cloning large eukaryotic DNA segments in *Escherichia coli*. *Biotechnology* 8:841-844.

13. Martin, C., L. Bresnick, R.-R. Juo, J. C. Voyta, and I. Bronstein. 1991. Improved chemiluminescent DNA sequencing. *Biotechniques* 11:110-114.

14. Old, R. W., and S. B. Primrose. 1985. *Principles of Gene Manipulation*, 3rd ed. Black-well Scientific Publications, Oxford, United Kingdom.

15. Sambrook, J., E. F. Fritsch, and T. Maniatis. 1989. *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.
16. Sanger, F., S. Nicklen, and A. R. Coulson. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74:5463-5467.
17. Schuster, D. M., G. W. Buchman, and A. Rashtchian. 1992. A simple and efficient method for amplification of CDNA ends using 5' RACE. *Focus* 14:46-52.
18. Slightom, J. L., R. F. Drong, and P. P. Chee. 1993. Construction of A clone banks, p. 121-146. In B. R. Glick and J. E. Thompson (ed.), *Methods in Plant Molecular Biology and Biotechnology*. CRC Press, Boca Raton, Fla.
19. Southern, E. 1975. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* 98:503-507.
20. Winnacker, E.-L. 1997. *From Genes to Clones: Introduction to Gene Technology*. VCH, New York.

Глава 15. Клеточные технологии в животноводстве

Цель: Ознакомиться с микрохирургическими манипуляциями на уровне гамет и эмбрионов животных.

После изучения главы студент сможет:

- дать определение следующим терминам и понятиям: “трансген”, “трансгеноз”, “клон”, “клонирование”, “агрегация”, “дисекция”, “монозигота”, “химера”;
- охарактеризовать микротехнологии, применяемые на молекулярном уровне клетки животных;
- охарактеризовать микротехнологии, которые применяются на клеточном уровне у животных;
- дать разъяснение методам, благодаря которым можно получить трансгенных и клонированных животных;
- раскрыть возможности генетического резерва животных с целью их применения в биотехнологии;
- проводить исследования по биотехнологии в животноводстве с применением методов эмбриоинженерии.

* * *

Изменить генотип животных на уровне клеток репродукции можно методами биотехнологии при воздействии непосредственно на ДНК (корректировка на уровне молекулы), ядро (корректировка на уровне ядра) или бластомеры (корректировка на уровне клетки).

Корректировка на молекулярном уровне предполагает применение рДНК для получения методом трансгеноза трансгенных животных. При ядерных микроманипуляциях производят перенос ядер, выделенных из соматических клеток в энуклеированные яйцеклетки с целью получения клонированных животных. А микроманипуляции на уровне всей клетки осуществимо при воздействии на эмбрионы, когда получают либо монозиготных животных, что возможно при использовании метода дисекции (бисекции), либо химерных животных, что возможно при объединении бластомер, принадлежащих разным генотипам. Особенностью данных технологий является то, что если при первой технологии – трансгенозе меняется генетическая программа клетки, а в будущем и всего организма животных, то при второй (пересадке ядер) и третьей (бисекции) технологиях – биологическая программа развития животных (биокопирование). Генетическая программа клетки меняется благодаря трансгенозу при успешной интеграции рДНК, которая сопровождается, в дальнейшем, его экспрессией и, в результате, трансгенный организм приобретает такие возможности, которые не были генетически запрограммированы. Изменение биологической программы означает изменение биологических принципов развития животных, что осуществимо при клонировании.

15.1. Трансгенные животные

Метод, при котором осуществляют искусственный перенос гена из одной биологической системы в другую, называют трансгенозом.

Предпосылками для проведения генетических манипуляций с гаметами и эмбрионами млекопитающих послужили следующие биологические особенности:

1. Особенности животных на молекулярном уровне – это основные свойства гена, такие как постоянство, дискретность и аллельность. Благодаря тому, что большинство качественных признаков имеют моногенный тип наследования, стало возможным конструировать эти гены, с целью применения в животноводстве для повышения продуктивных качеств и улучшения резистентности животных.

2. Особенности животных на клеточном уровне – это гаметогенез, оплодотворение и предимплантационное развитие эмбриона. Благодаря тому, что оогенез можно регулировать с помощью гормонов, был создан метод суперовуляции, который снял ограничения в получении необходимого числа ооцитов, требуемых для микроманипуляций. Метод экстракорпорального оплодотворения, в свою очередь, обеспечил получение зигот, что является необходимым условием для ввода генно - инженерных конструкций. А предимплантационное развитие эмбриона “позволило” применить метод культивирования. Создание реанимационных условий для зигот, претерпевших трансгеноз, является необходимым условием в получении трансгенного потомства. Так как для пересадки используются только биологически полноценные зиготы и эмбрионы, поэтому методом культивирования отбираются для трансплантации только те зиготы, которые успешно реанимировались после трансгеноза и образовали эмбрион на стадии 2-х бластомер.

Таким образом, используя различные методы биотехнологии, мы сначала воздействуем на воспроизводство с целью получения предимплантационных эмбрионов, а затем воздействуем методами микротехнологии на геном и после метода культивирования переносим их инкубационной матери для нормального завершения эмбриогенеза.

Животное является *трансгенным*, если в его геноме наблюдается экспрессия чДНК. Получение трансгенных мышей победоносно определило судьбу метода трансгеноза. Впервые трансгенные мыши были получены при инфицировании предимплантационных эмбрионов ретровирусами. Введение генной конструкции в живой организм информативен тем, что дает возможность проследить функционирование гена в процессе развития в условиях нормальной физиологии.

Для трансгенных животных характерно:

1. Интеграция чужеродных генов в геном происходит стабильно с частотой 0,5 - 1,3% от числа инъецированных зигот.

2. После инъекции способны к развитию от 5 до 20% зигот.

3. Идентификация трансгенных животных основана на обнаружении в их геноме инъецированной чужеродной ДНК и наличия у них продукта экспрессии чужеродного гена (мРНК, рекомбинантный белок).

4. Экспрессия чужеродных генов носит тканеспецифический характер.

5. Экспрессия встроенного чужеродного гена может приводить к изменению фенотипа животных.

6. Трансгенные животные передают потомкам чужеродный ген.

В зависимости от цели использования трансгенные животные делят на две категории:

1. Трансгенные животные для получения новых продуктов, например, синтеза ценных белков, которые необходимы для медицины и ветеринарии.

2. Трансгенные животные с увеличенными селекционируемыми признаками и повышенной резистентностью.

Первое трансгенное животное получено среди мышей в 1976 году, а к настоящему времени уже получены среди сельскохозяйственных животных трансгенные овцы (1986 год), крупный рогатый скот (1987 год), свиньи (1989 год). Кроме того, уже получены трансгенные птицы и рыбы.

15.1.1. МЕТОДОЛОГИЯ В ПОЛУЧЕНИИ ТРАНСГЕННЫХ МЫШЕЙ

Трансгеноз у животных можно осуществить следующими методами:

Таблица 15.1. Этапы работ по эмбриоинженерии на молекулярном уровне в животноводстве			
№	Этап работы	Последовательность процедур	Методика
1	2	3	4
1	Получение рДНК	Получение чДНК и вектора	<p>Используют два метода получения чДНК из эукариот:</p> <p>1) метод вырезания, когда чДНК выделяется с помощью ферментов-рестриктов из отдельного фрагмента ДНК;</p> <p>2) химический синтез чДНК с применением полимеразной цепной реакции.</p> <p>Важное условие – это полная информация о получаемых генах, что возможно при использовании метода секвенирования.</p> <p>Векторами являются плазмиды, бактериофаги и космиды.</p> <p>При конструировании рДНК, предназначенного для трансгеноза в геном животных используются плазмиды и бактериофаги, для получения которых на них оказывают воздействие рестриктами с целью приготовления участка, куда будет вставлена чДНК.</p>
		Конструирование рДНК	При лигировании “липких” концов чДНК и вектора образуется в условиях <i>in vitro</i> кольцевая рДНК.
		Клонирование рДНК	Полученная рДНК трансформируется в бактериальную клетку для размножения. Важное условие перед клонированием – проведение скрининга, а для клонирования – наличие сильного промотора.

1	2	3	4
2	Получение зиготы на стадии двух пронуклеусов	Суперовуляция самок-доноров	С помощью гормонов репродукции индуцируют у самки суперовулированный фолликулогенез. Параллельно подготавливают методом синхронизации самок – реципиентов.
		Осеменение	Осеменяют индуцированных самок дважды с интервалом 10 - 12 часов.
		Вымывание зигот	Зиготы вымывают через 10 - 12 часов после предполагаемого оплодотворения.
		Оценка, селекция отбор	Отбирают для трансгеноза только биологически полноценные зиготы на стадии двух пронуклеусов.
3	Трансгеноз в мужской пронуклеус зиготы	Подготовка рДНК	Приготавливают генно-инженерную конструкцию для трансгеноза. Для этого клонированная ДНК лианизируется и из вектора удаляются не нужные фрагменты.
		Подготовка камеры и микроинструментов	Для трансгеноза пользуются микроманипулятором и инвертированным микроскопом с фиксированным штативом. Микроинструменты подготавливают в специальных микрокузницах.
		Подготовка зиготы	В микрокапле по 15 - 20 штук подготавливаются зиготы на стадии двух пронуклеусов.
		Трансгеноз	Для трансгеноза используется ДНК в концентрации 1 - 2нг/мкл, которую методом микроинъекции вводят в мужской пронуклеус зиготы.
4	Трансплантация эмбриона	Культивирование зиготы	После инъекции зиготы собирают в микрокапли M16+BCA при 37°C и 5% CO ₂ и культивируют в инкубаторе 18 - 24 часа.
		Оценка, селекция и отбор	Биологически полноценными будут считаться эмбрионы на стадии двух бластомер.
		Пересадка эмбриона	Для пересадки с целью обеспечения синхронности между стадией развития эмбриона и стадией развития матки используют реципиентов 2-го дня цикла.
5	Скрининг трансгенного	ПЦР.	Трансплантаты подвергаются биопсии для последующего анализа ДНК методом ПЦР.

1. Микроинъекция рДНК в ядро сперматозоида или мужской пронуклеус зиготы.

2. Ретровирусная инфекция, при которой производят инфицирование предимплантационного эмбриона рекомбинантными конструкциями при их совместном культивировании.

3. Трансфекция бластомеров с последующей пересадкой трансформированных клеток в полость бластоцисты.

1. Метод микроинъекции. Метод микроинъекции чужеродного ДНК в мужской пронуклеус зиготы является на сегодняшний день наиболее предпочтительным.

Для осуществления этой процедуры необходимо пройти следующие шаги (табл. 15.1.):

1. Получение и приготовление рДНК.

2. Получение зигот на стадии двух пронуклеусов.

3. Микроинъекция раствора ДНК (рис. 15.1.) в концентрации 1–1,5 мкг/мл в объеме 1–2 пкл (10^{-12} л).

4. Культивирование *in vitro*.

5. Пересадка инкубационной матери, получение потомства.

6. Установление трансгенных животных с помощью ПЦР (анализ на выявление трансформантов).

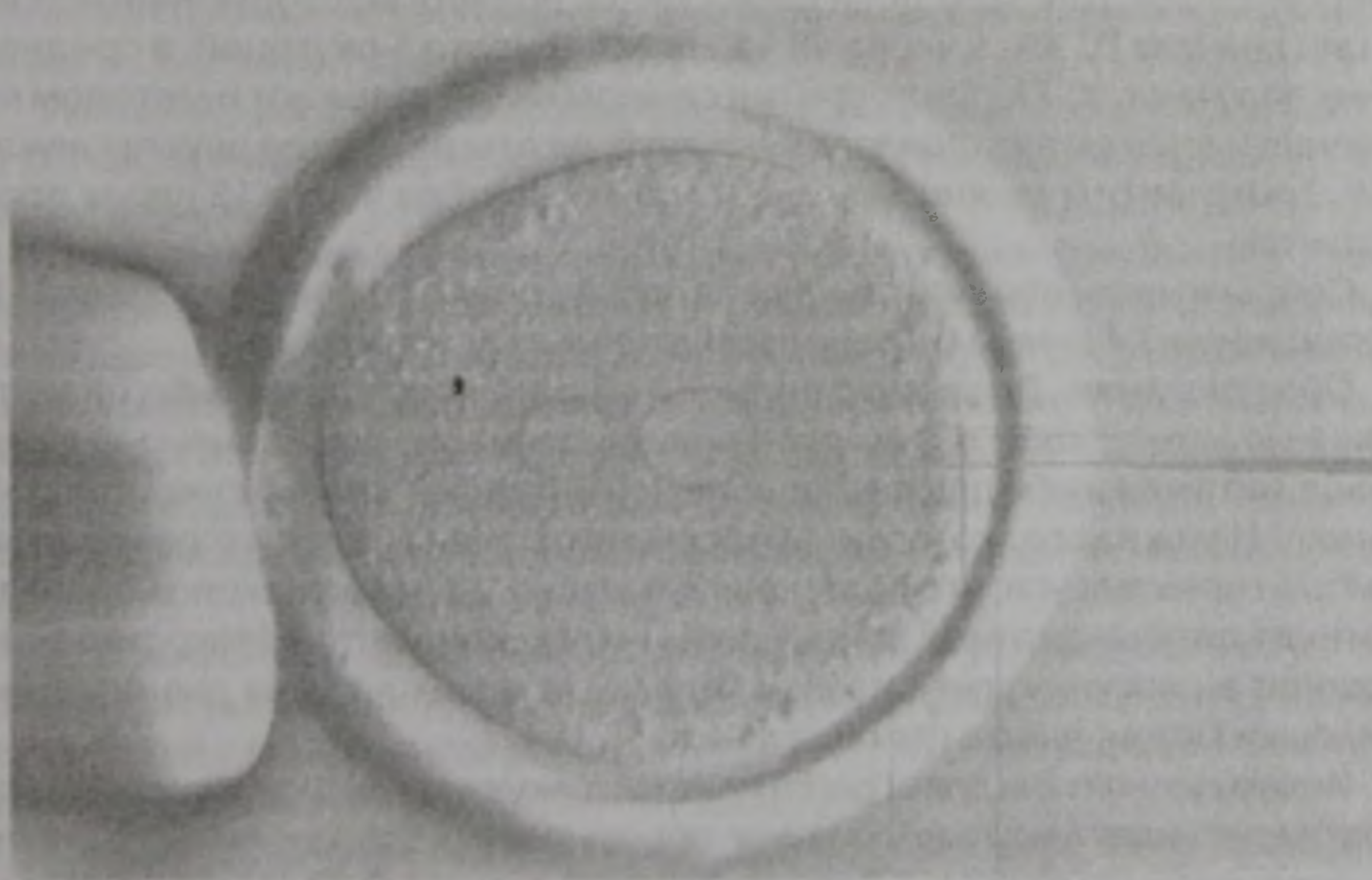


Рисунок 15.1. Трансгенез методом микроинъекции в мужской пронуклеус зиготы.

Приготовление ДНК для микроинъекции. Вводимый трансген свободен от вектора (вектор снижает экспрессию до 1000 раз) и имеет линейную форму. Линейные ДНК характеризуются в 5 раз большей частотой интеграции по сравнению с кольцевыми молекулами. Имеются удобные векторы,

несущие в своих полилинкерных последовательностях сайты для разрезания редкими рестриктазами, такими, как Not1 и Sfi1. Однократное воздействие такими ферментами позволяет чисто вырезать из вектора большие вставки.

Существует ряд методов, позволяющих получать фрагменты ДНК. Для целей микроинъекции важнейшее значение имеет их чистота. Особенно важно, чтобы образцы ДНК не были загрязнены органическими растворителями, способными оказать губительное воздействие на развитие зиготы. Процедура, которая чаще используется для этой цели, подразумевает очистку фрагмента ДНК в агарозе с низкой точкой плавления (BRL) и последующее прямое выделение ДНК из геля с помощью препаративной ионообменной колоночной хроматографии (NACS - 52 Prepac, BRL).

Для трансгеноза используется ДНК в концентрации 1—2 нг/мкл, что соответствует 200 — 400 копиям фрагмента ДНК длиной 5kb. В этом случае частота интеграции ДНК составляет 20 — 40%. Число интегрированных копий можно уменьшить снижением концентрации ДНК. Однако, снижая концентрацию ДНК, надо помнить, что при этом значительно падает общая частота интеграции. С другой стороны, применение слишком высоких концентраций ДНК (например, 10 нг/мкл) резко снижает выживаемость эмбрионов.

Получение зигот. Получение большого количества оплодотворенных яйцеклеток на стадии 2-х пронуклеусов возможно при использовании метода суперовуляции. Для этой цели самку мышь подвергают гормональной индукции сначала ГСЖК, а через 48 часов чХГ. Вместо 5 овуляций, в среднем, от них получают 10. После покрытия самцом их умерщвляют и методом вымывания извлекают из фаллопиевых труб зиготы на стадии двух пронуклеусов. Такие зиготы можно извлечь из самки-донора через 12 часов после покрытия.

Собранные зиготы культивируют в забуференной фосфатом среде M16, обогащенной 0,4%-ным бычьим сывороточным альбумином.

Оборудование. Для микроинъекций обычно используют либо инвертированные микроскопы с фиксированным штативом, оснащенные выпрямляющей оптикой, либо дифференциальной интерференционно-контрастной оптикой Номарского, которые обеспечивают очень хорошее разрешение мембран пронуклеуса, что облегчает инъекцию. Для микроскопов обоих типов подходит стандартный лейцевский микроманипулятор. Микроинъекции проводят в плоских культуральных каплях, лежащих либо на дне пластиковой чашки Петри, либо в стекле с лункой.

Инъекционная игла для обработки на микроузнице де Фонбрюна. Эти иглы делают из стандартных толстостенных капилляров (из боросиликатного стекла), наружный диаметр которых 1,0 мм, внутренний диаметр 0,58 мм, длина 15 см.

Микроинъекция. Прежде чем начать микроинъекцию необходимо подготовить камеру и инструменты.

Подготовка камеры. Микроинъекция проводится в каплях РВІ. В капли РВІ с помощью пастеровской пипетки с оттянутым кончиком вносят по 2 яйца, предназначенные для проведения инъекции. Затем камера помещается на предметный столик микроскопа.

Подготовка инструментов. Кончик иглы заполняется ДНК до установки на микроманипуляторе. Для этого помещают тупой конец иглы в раствор ДНК и оставляют на 1 — 2 мин. Под действием капиллярной силы раствор ДНК, будет подниматься вдоль внутреннего стеклянного волокна (можно видеть, как он собирается у кончика иглы). Так вводится 1 мкл ДНК — объем, достаточный для того, чтобы игла выполнила свое предназначение. Далее игла помещается в инструментодержатель и закрепляется на манипуляторе.

Инъекция в пронуклеус. Для этой цели в микрокапле по 15 - 20 штук подготавливаются зиготы на стадии двух пронуклеусов. С помощью удерживающих пипеток зигота фиксируется. После чего осторожно производится микроинъекция в мужской пронуклеус зиготы. Мужской пронуклеус располагается дальше от полярного тельца, кроме того, он имеет большие размеры, чем женский, и поэтому он более удобен для проведения микроинъекций.

После того как все зиготы, находящиеся в камере, будут инъецированы, их собирают в каплю M16 + БСА при 37°C с 5% CO₂ в воздухе и культивируют в инкубаторе в течение ночи.

Большинство проблем, возникающих при микроинъекциях, связаны с закупориванием инъекционной иглы (капельками масла, белками). Дефекты инъекционной иглы обычно приводят к лизису яйца. Степень лизиса может различаться от полного до частичного, при этом по ходу культивирования может произойти регуляция дефекта, но большинство таких яиц не достигает 2 - клеточной стадии.

Использование удерживающих пипеток вызывает проблемы, связанные со слишком сильным присасыванием зиготы к пипетке, что приводит к ее повреждению.

Трансплантация эмбрионов. Зиготы, подвергшие трансгенозу, трансплантируют самкам - реципиентам через день после культивирования *in vitro*. Такое культивирование для зигот необходимо потому, чтобы она могла биологически реабилитироваться после механического и молекулярного воздействия. При таком культивировании обычно у 10 - 20% зигот наступает блок в развитии. Поэтому более целесообразным является пересадка тех зигот, которые при культивировании образуют эмбрионы на стадии двух бластомер.

Для мышей при пересадке эмбрионов важным условием для их успешной имплантации является покрытие стерильным самцом. Только в этом случае у мышей - реципиентов образуется желтое тело беременности, которое необходимо в подготовке матки к имплантации.

Скрининг трансгенного потомства. Трансгенные трансплантаты подвергаются для выявления инъецированных последовательностей ДНК биопсии для последующего анализа ДНК.

В некоторых случаях анализ на трансгенность необходимо проводить на уровне плодов. Например, возможна ситуация, когда определенная генная конструкция, экспрессируясь во время эмбриогенеза, обуславливает пренатальную гибель. В этом случае анализ уже родившихся животных продемонстрирует низкую частоту трансгенных особей.

Анализ ДНК. Для первоначального анализа на трансгенность предложен ряд разнообразных методик. Обычно пользуются следующими методами: саузерн - блот, дот-блот-гибридизация (способ блоттинга и гибридации — это щелочной перенос на нейлоновые мембраны и гибридизация с зондами, мечеными олигонуклеотидной затравкой) и ПЦР (глава 14.6.).

Трансгенные животные, полученные путем инъекции ДНК в пронуклеусы, в большинстве случаев не мозаичны и соответственно передают новый ген 50% потомков. При инъекции интегрируемый ген в местах вставки вызывает перестройки ДНК.

2. Перенос генов с помощью ретровирусов. Как указывалось выше, ретровирусы используются для получения трансгенных мышей путем воздействия инфекционным вирусом на предимплантационные эмбрионы. При этом частота трансформации зародышевой линии близка к той, которую мы наблюдаем при микроинъекциях ДНК, а сама техника эксперимента намного проще. Ранние морулы освобождаются от ZP, подвергаются кратковременному воздействию инфекционным вирусом и трансплантируются самкам-реципиентам. Различные способы ретровирусного генного переноса основаны на получении высокого титра клеточных линий, продуцирующих вирус. Метод применяют в случаях, необходимых для производства рекомбинантного белка организмом трансгенных животных.

Важное преимущество использования ретровирусов заключается в возможности их введения в эмбрионы более поздних стадий развития, чем предимплантационные, а также в специфические ткани взрослого животного. При инфекции клеток на разных этапах дифференцировки вирус может оказаться уникальным маркером потомков отдельных клеток, позволяющим проследить судьбу клеточных линий. Этот подход очень перспективен при анализе сложных линейных отношений у эмбрионов млекопитающих и в тканях взрослых животных, например кроветворной ткани.

Возможность избирательного введения генов с помощью ретровирусов в кроветворную ткань взрослых организмов позволяет надеяться на реальность исправления дефектов, обусловленных единичным геном, таких, например, как синдром комбинированного иммунодефицита. В настоящее время уже разработаны методики, обеспечивающие высокую эффективность трансформации стволовых клеток гемопоэза, однако прежде, чем приступить к обсуждению практических вопросов применения в клинике, необходимо решить ряд проблем, касающихся стабильности экспрессии и безопасности.

Трансгенные животные, полученные путем интеграции ретровирусов, всегда являются мозаиками с одним или более сайтов интеграции в различных клетках. Это обусловлено тем, что эмбрионы обычно инфицируются на стадии ранней морулы, состоящей из 8 — 16 клеток. Поэтому для обнаружения потомства, несущего вставочную последовательность, полученную с помощью ретровирусов, необходим скрининг. Ретровирусы обычно интегрируются в виде единственной копии генов в разные сайты генома хозяина и в местах вставки не вызывают перестроек ДНК. Поэтому они позволяют более четко

интерпретировать позиционные эффекты, обусловленные местом интеграции чужеродной ДНК, и облегчают клонирование сайта инсерции (вставки), что особенно важно для молекулярного анализа инсерционных мутаций. Поскольку сигналы контроля транскрипции самих вирусов в разнообразных тканях и, особенно, в клетках ранних эмбрионов слабы, для обеспечения как повсеместной, так и тканеспецифической экспрессии введенных генов использованы ретровирусные векторы, несущие соответствующие промоторы и энхансеры.

Важно помнить также, что существуют ограничения. Первое ограничение связано с упаковкой длины геномной РНК вируса. Эти векторы могут передавать только небольшие фрагменты ДНК в пределах 8 — 10kb. Второе ограничение связано с последствиями после применения ретровирусной инфекции. Так как этот метод не исключает образование патологических отклонений у индивидов, что недопустимо в животноводстве, ведь в конечном счете, коммерческие продукты, получаемые от животных, попав на прилавки магазинов и аптек, будут источниками для непредвиденных для человека генно - инженерных катаклизмов. Поэтому при получении трансгенных сельскохозяйственных животных методом ретровирусной инфекции не имеет по сравнению с методом микроинъекции столь широкого распространения.

3. Трансфекция бластомеров с последующей пересадкой трансформированных клеток в полость бластоцисты (метод Эванса).

Культивируемые эмбриональные стволовые клетки инфицируют ретровирусными векторами, поддерживают их в культуре, а затем вводят их методом инъекции в полость бластоцисты мышей. При данной методике эмбриональные стволовые клетки (ES) инфицируют в культуре с ретровирусными векторами. В этом случае интеграция чужеродного гена носит случайный характер. Трансген либо интегрируется в различных участках (положительная интеграция), либо в одном конкретном месте (отрицательная интеграция). Для обнаружения интегрируемого сайта используют либо метод ПЦР, либо метод нон-специфической интеграции, названной как метод положительно-отрицательного выявления и отбора интегрируемого чужеродного сайта. Важным условием в использовании второго метода является то, что в составе вектора необходимо наличие четырех структур:

1) два блока ДНК-последовательностей (НВ1; НВ2), которые гомологичны со специфическими сайтами хромосом клетки, где происходит интеграция чДНК;

2) трансген (TG), который при интеграции и экспрессии обеспечивает для индивида фенотипическое проявление;

3) ген Neor – это ДНК-последовательность, обеспечивающая высокую сопротивляемость к компоненту G - 418;

4) два гена для тимидин-киназы (tk1; tk2), выделенные из вируса лишая типов I и II (HSV-tk1; HSV-tk2).

После трансфекции при культивировании с компонентом G -418 сохраняют свою жизнедеятельность только те клетки, в которых произошла интеграция генов Neor и TG.

Использование ЭС-клеток (ES) позволит успешно контролировать число ретровирусных инсерций *in vitro*, выделять специфические вставки до реинтродукции в эмбриональную линию с помощью методов генетики соматических клеток. Благодаря этому подходу удалось сконструировать линию мышей, несущих мутацию в гене гипоксантин - фосфорибозилтрансферазы.

Применение ретровирусной технологии может быть также использовано для трансформации клеток зародышевого пути других видов млекопитающих, у которых получение трансгенных животных невозможно из-за отсутствия разработанных систем культивирования эмбрионов или из-за затруднений с микроинъекцией в зиготу.

15.1.2. Трансгенные сельскохозяйственные животные

Селекционные аспекты разведения животных основаны на получении чистопородных резистентно стойких и высокопродуктивных сельскохозяйственных животных. Выборочное разведение таких животных до недавних пор было единственным путем в повышении их генетических характеристик. Используя классические методы селекции можно через несколько поколений либо устранить нежелательный ген, либо наоборот, закрепить желаемый ген в получаемом новом поколении. Такая работа проводится по определенной селекционной программе, обязательным условием которой является поэтапное тестирование (для каждого поколения) получаемых животных на присутствие гена в определенных дозах – двойной для гомозигот и одинарной для гетерозигот.

Сегодня при разведении сельскохозяйственных животных с целью получения конкурентно способной продукции внедряются методы, основанные на применении новейших технологий. Одним из наиболее перспективных методов является перенос молекулярных конструкций в геном животных. Общий принцип стратегического использования молекулярных конструкций основан на следующих позициях: рДНК переносят в ядро оплодотворенной яйцеклетки, последний трансплантируют в матку реципиента для имплантации и рождения животного, в чей геном был интегрирован чужеродный ген (глава 14). Разведение трансгенных животных основано на получении новых генетических линий. Данная технология имеет большое практическое применение. Например, при успешной интеграции рекомбинантный ген экспрессируясь в организме животного стимулирует для них ускоренный рост, что сопровождается низкими издержками производства.

Расчеты показали, что генетический прогресс с применением методов биотехнологии воспроизводства может быть увеличен по молочной продуктивности у коров на 14%, мясной – на 17%, шерстной – на 12%. Если прогнозировать улучшение генетического материала у животных методами эмбрионинженерии, то теоретически можно ожидать следующие результаты: при клонировании животных молочную продуктивность коров можно увеличить на 20 - 25%, мясную на 30% и шерстную на 20%, при трансгенозе – на 70 - 80%, 80 - 90% и 40 - 50% соответственно. Кроме того, теоретически выявле-

но, что нужно выделить примерно 75 - 80 фрагментов ДНК, чтобы охарактеризовать геном по признаку молочной продуктивности, примерно 140 - 160 фрагментов ДНК – по признаку мясной продуктивности и 80 - 150 фрагментов ДНК – по шерстной продуктивности.

Из всего вышеизложенного следует, что конечная цель эмбриоинженерных исследований в животноводстве направлена на выяснение генетической природы изменчивости количественных признаков с дальнейшим увеличением продуктивности в выгодных для человека позициях.

При трансгенозе чужеродный ген интегрируется в геном только в 5% случаев. При этом от 100% зигот, подвергшихся трансгенозу, только 66% сохраняют биологическую полноценность, 40% имплантируются в матку и 25% рождаются. Это свидетельствует о том, что от 1000 инъецированных зигот рождаются 30 - 50 трансгенных животных. От полученных трансгенных животных не все организмы будут иметь "подходящую" характеристику, так как ген может интегрироваться: 1) в разные локусы; 2) в один локус и 3) стать для генома из-за "серийной" репликации сверхэкспрессивным, что приводит к нарушению физиологии животного. Поэтому от числа родившихся трансгенных животных только один процент особей будет нести желательные признаки. Следовательно, при внесении чужеродного ДНК в новый генотип, который по многим позициям отличается от генотипа, из которого был получен чужеродный ген, поведение последнего не предсказуемо. Примером могут послужить трансгенные мыши, которым был инъецирован гормон роста из крыс. Несомненно, что они имели высокий темп роста, но в то же время они не отличались хорошим здоровьем и были бесплодными.

Поэтому в животноводстве использовать трансгенных особей для получения продуктов животного сырья и ускоренного размножения нужно только после прохождения ими всех испытательных программ. Для того чтобы начать распространение нового генотипа требуется, по крайней мере, три поколения. В среднем, интервал между поколениями составляет 3 года, поэтому потребуются примерно 10 лет для того, чтобы новый генотип стал пригодным для масштабного распространения.

Новая технология предполагает обнаружить, изолировать, извлечь и клонировать фрагмент ДНК, несущий конкретный ген и трансформировать его в новую биологическую установку. Под биологической установкой подразумевают животных, принадлежащих другому виду (например, перенос гена от животных бактериям или от одного вида животных другому) или другой породе.

Для животноводов особый интерес в последние годы представляют следующие четыре гена: 1) ген "Борула" (Boroola), который обеспечивает для овец высокий прирост; ген впервые открыт у мериносовых овец Австралии; 2) ген "N" (N - type fleeces), создающий у овец особенно хороший ковровый тип руна; хорошо развит у овец породы ромни из Новой Зеландии; 3) ген "двойной мускулатуры" (double muscling), вызывающий дополнительное развитие мышечной ткани; хорошо развит у крупного рогатого скота европейского происхождения; 4) ген "h" (halothane) у свиней с плейотропным эффек-

том, так как высокий выход нежирного мяса сопровождается высокой восприимчивостью.

Многие исследовательские группы в области молекулярной биотехнологии заинтересованы в нахождении и использовании генов, имеющих полезное и специализированное действие. Но основной проблемой для исследователей в этой области является то, что для того, чтобы обнаружить и изолировать нужный ген, вначале необходимо распознать его продукт. Из четырех вышеперечисленных генов на сегодняшний день только один ген "h" идентифицирован.

Тем не менее, есть другие гены, которые идентифицированы и имеют потенциальное использование, это гены гормона роста, инсулина, казеина, фактора свертываемости крови и многое другое, а также гены различных аминокислот. Продукты этих генов применяются в медицине, фармакологии, диетологии и животноводстве. Для фармакологии и медицины созданы биофабрики в лице бактерий, которые производят основные белки и аминокислоты. В животноводстве широкое применение имеет гормон роста, который влияет на физиологическую функцию животного, обеспечивая эффект роста, так как увеличивает мускулатуру, удои без потери питательности и выход шерсти.

Создание трансгенных животных, которые будут иметь высокую сопротивляемость к инфекционным заболеваниям (у коров к маститу, у свиней к дизентерии, у птиц к холере и т.д.) – это будущее, к которому стремятся биотехнологи-селекционеры. Перспективы получения трансгенных животных настолько грандиозны, что теоретически это выглядит следующим образом. Стоимость всех ветеринарных мероприятий (прививки, лекарства, физическая изоляция, тестирование) с целью предотвращения болезней составляет 20% от себестоимости получаемого животноводческого сырья в промышленном масштабе. При получении трансгенных животных этот расход можно сократить до 5% (теория "безоблачности"). Конечно, это ни чем необоснованные утверждения. В любом деле имеются положительные и отрицательные стороны. Получение трансгенных животных – не исключение. Увеличение продуктивности и повышение резистентности – это положительные аспекты биотехнологии в животноводстве, а влияние на естественное биоразнообразие, нарушение естественной генетической вариации – это отрицательные аспекты биотехнологии. И этот список можно продолжить.

Если молочная железа выполняет работу биореактора в молочном скотоводстве, то каждая корова может выдать приблизительно 10000 литров молока. Другими словами, если рекомбинантный белок в 1 литре молока составлял бы один грамм, и он мог бы быть очищен с 50% эффективностью, то 20 коров будут производить почти 100 кг данного рекомбинантного белка в год.

Впервые трансгенных двух телят получили в 1997 году после пересадки 2470 инъецированных зигот. Американскими учеными Фирстом и Роблом разработана рДНК, которая будет воздействовать на геном с двойным положительным эффектом. Американский специалист Левемен указывает, что в США самый большой вклад в увеличении молочной продуктивности дает

ген гормона роста. В результате, с применением этого гена, планируется в США повысить средний удой молока на корову до 9800кг, а число коров при этом сократить до 30%.

В настоящее время трансгенные коровы имеют широкое применение. Вот только три примера:

1) в диетологии большое значение имеет получение молока, свободного от лактозы, что стало возможным благодаря трансгенным коровам и, сейчас люди, которые не способны освоить лактозу могут употреблять в пищу молоко;

2) в сыроделии для приготовления сыра получают трансгенных коров, молоко которых насыщено казеином;

3) в фармакологии для получения моноклональных антител.

В области овцеводства австралийскими учеными под руководством профессора Скотта планируется с помощью рДНК усилить у овец резистентность к болезням и получить овец с ускоренным ростом шерсти. Но в большинстве случаев на сегодняшний день, так же как и от коров, от трансгенных овцематок получают вместе с молоком фармакологические белки.

В свиноводстве применение гена гормона роста ограничено тем, что хотя ген и обеспечивает ускоренные темпы роста, но в то же самое время этот эффект сопровождается образованием язв в желудке, почечной недостаточностью, воспалительными процессами и пневмонией. Исследования в области свиноводства направлены на то, чтобы их органы, в будущем можно было использовать для трансплантации. Уже проведены первые эксперименты по пересадке органов свиней приматам. Эксперимент, хотя в целом и был неудачным, но процесс отторжения органа был "отодвинут" для организма приматов на более поздние сроки.

Методика получения трансгенных птиц и рыб имеет существенные различия по сравнению с методикой по получению трансгенных сельскохозяйственных животных. Так как различия в биологии развития птиц, рыб и млекопитающих животных существенны. До настоящего времени получение трансгенных птиц все еще остается затруднительным. Среди рыб получены трансгенные карпы, форели, лосось.

15.2. Трансплантация ядер в энуклеированную яйцеклетку

Современные методы трансплантации ядер позволяют вмешиваться в генетическую организацию яиц и эмбрионов животных. Благодаря этим методам удалось достигнуть больших успехов в ряде областей биологии развития, в частности в изучении:

- а) вклада материнского и отцовского геномов в развитие;
- б) ядерно - цитоплазматических отношений;
- в) морфогенетических потенций ядер, трансплантированных в яйца из эмбриональных клеток и возможностей их «клонирования»;
- г) репродукции млекопитающих путем партеногенеза.

Эти исследования позволили осмыслить функциональные различия между геномами родителей, однако точные механизмы ограничения роста у яиц, получивших донорские ядра с более поздних стадий развития, или у партеногенетических яиц пока не известны.

Поскольку пронуклеусы и ядра яиц и ранних эмбрионов имеют относительно крупные размеры, введение в яйцо пипетки с диаметром отверстия, достаточным для захвата такого ядра, обычно необратимо повреждает мембрану яйца и приводит к лизису. В связи с этим предложен эффективный метод извлечения ядра в небольшом объеме цитоплазмы. Такие нуклеопласты могут быть слиты с другими яйцами или клетками с помощью вируса Сендай. Указанный метод позволяет получить в ходе одного четырехчасового эксперимента до 100 энуклеированных яиц или 40—50 реконструированных яиц.

Вирус Сендай, или гемагглютинирующий вирус (японский штамм), используется в качестве фузогена (фактора, вызывающего слияние клеток). Процедура выращивания вируса в развивающихся куриных яйцах подробно изложена в работах, указанных в дополнительных источниках (список рекомендуемой литературы), здесь приводится только ее краткое описание. Высокая концентрация фузогенного вирусного препарата может вызвать интенсивный лизис клеток, низкая же, напротив, не обеспечит эффективного слияния клеток. Разведенный препарат вируса Сендай в течение недели не теряет фузогенной активности, если препарат хранится при 4°C.

Манипуляции желательно проводить в условиях кондиционированного воздуха, так как высокая температура — выше 20°C или (71°F) делает клеточные мембраны более липкими, тяжелое парафиновое масло становится менее вязким, затрудняя работу оператора и повышая число неудачных операций.

Для работы с яйцами, для загрузки и разгрузки манипуляционных камер рекомендуется стандартный просвечивающий микроскоп, например Wild.

Чтобы получить тонко оттянутые микропипетки, нужен простой электродный прибор для оттягивания пипеток. Приборы различных конструкций можно приобрести или усовершенствовать в лабораторной мастерской. Кроме того, требуются некоторые приспособления для заострения кончиков игл для переноса ядер.

Эмбрионы на стадиях дробления, используемые в экспериментах по трансплантации ядер, могут быть получены либо вымыванием их из яйцевода или матки, либо путем культивирования начиная с 1- или 2-клеточной стадии *in vitro*. Энуклеированные ооциты получают при культивировании третичных фолликулов *in vitro*.

Гетерозиготные диплоидные гиногенетические яйца могут быть получены путем использования гаплоидных партеногенетических яиц. Обнаружено, что развитие гетерозиготных яиц с материнским геномом не отличается от развития партеногенетических яиц, которые были диплоидизированы путем подавления формирования второго полярного тельца. Подобным образом можно получить разнообразные анеуплоидные яйца. Перенос в перивителлиновое пространство в течение короткого времени одного за другим нескольких кариопластов, может привести к их слиянию с плазматической

мембраной яйца и к созданию триплоидных или тетраплоидных яиц с разным числом материнских и отцовских геномов.

Частота слияния во многом зависит от качества препарата-вируса Сендай. При хорошем качестве препарата и соблюдении всех условий частота слияния превышает 90%. Если реконструкция яйца осуществилась, с ним можно обращаться как с любым другим яйцом. Такие яйца можно культивировать *in vitro*, для изучения предимплантационного развития или: перенести псевдобеременным реципиентам для наблюдения над развитием *in vivo*. Эмбрионы 1-, 2- или даже 4-клеточной стадии могут быть перенесены в яйцеводы реципиента 1-го дня, а на стадии поздней морулы/ранней бластоцисты — в матку реципиента 3-го дня. (При этом рекомендуется в другой яйцевод или рог матки перенести нормальный эмбрион для контроля эффективности псевдобеременности и оценки индивидуальных различий.) Реконструированные яйца можно использовать при получении агрегационных химер или при конструировании бластоцист, а также для анализа белков и ферментов или хромосом.

Развитие диплоидных партеногенетических, гиногенетических или андрогенетических эмбрионов после их переноса псевдобеременным реципиентам редко продолжается дольше 10 или 11 дня. На этой стадии их морфологическая организация в большей или меньшей степени аномальна, но ткани живы и достаточно здоровы, чтобы быть объектом биохимического анализа.

Несмотря на некоторые успехи в применении вирусов и химических соединений (полиэтиленгликоль-ПЭГ), в качестве агентов, вызывающих слияние, следует признать, что их использование в экспериментах на яйцах млекопитающих имеет некоторые существенные ограничения. Было обнаружено, что ПЭГ, наиболее широко используемый химический фузоген соматических клеток, очень ненадежен в исследованиях на ранних эмбрионах. Его активность может варьировать, кроме того, он способен вызывать интенсивный лизис и препятствовать развитию, поскольку с трудом удаляется с плазматической мембраны.

Несмотря на то, что вирус Сендай оказался более удачным фузогеном для яиц млекопитающих, применение этого агента имеет ряд недостатков. Всегда существует риск, хотя и незначительный, что некоторые вирусные частицы в препарате останутся вирулентными, а это имело бы катастрофические последствия для колонии животных. Было обнаружено, что вирус Сендай в качестве фузогена эффективен для кариопластов яиц и очень ранних эмбрионов. При попытках слить клетки эмбрионов более продвинутых стадий развития или тканей взрослых животных степень слияния падает до 0 - 10%. Далее, если вирус Сендай был применен для слияния кариопласта с яйцом, бластомеры, образовавшиеся из такого реконструированного яйца, уже не могут впоследствии служить донорами ядер, так как повторное применение вируса не будет эффективным. Можно полагать, что причиной этого феномена является потеря рецепторов клеточной поверхности, способных связывать вирус. Во всяком случае, это обстоятельство исключает возможность серийных ядерных трансплантаций, осуществляемых только с помощью вируса Сендай. Кроме того, свойства вируса, как и ПЭГ, варьируют в зависимости от партии.

Наиболее перспективным представляется метод слияния клеток, включающий использование электрического тока.

Этот метод в высшей степени эффективен. Его основное преимущество заключается в возможности менять условия в зависимости от типа клетки и осуществлять серийные ядерные трансплантации. В соответствии с этой методикой клетки сначала получают импульс переменного тока, вызывающий образование тесных контактов и соединение, или «агглютинацию». Вслед за этим следует импульс постоянного тока, приводящий к разрушению клеточных мембран в месте контакта и, в конечном счете, к слиянию клеток. При этом силу тока, длительность воздействия, число импульсов, а также среду, в которой осуществляется слияние, а затем и культивирование, температуру и предварительную обработку клеток можно варьировать, создавая оптимальные условия для слияния клеток данного типа. С помощью этого метода уже достигнуты определенные успехи, следовательно, можно считать, что некоторые из параметров слияния уже установлены.

15.3. Клонированные животные

Понятие «клон» имеет греческое происхождение и означает «отпрыск». В научной трактовке клонирование – это процесс получения множественных копий от первоначальной единичной молекулы, клетки или особи. К клонированным животным относят группу генетически идентичных организмов, родоначальником которых является одна особь (или один эмбрион).



Рисунок 15.3. Овечка Долли.



Рисунок 15.2. Я. Вилмут.

Овечка Долли, которая была получена Шотландскими учеными (Я. Вилмут; рис. 15.2), вызвала бурный всплеск научных дискуссий на тему клонирования. Среди ученых имеются как сторонники, так и ярые противники клонирования. Одни ученые утверждают (сторонники), что за клонированием стоит будущее, а другие (противники) – что клонирование может привести наше будущее к биологическим катаклизмам.

Следует отметить, что противоречивость наблюдается и на уровне тех

знаний, которые мы имеем на сегодняшний день в области молекулярной биологии клетки и развития животных. Каждая клетка функционально ориентирована благодаря получаемым "биоинструкциям", следовательно, генетический ресурс ядерного аппарата имеет равную возможность для "дачи этой инструкции" на уровне клеток, а в будущем и организма. Но известно, что соматическая клетка способна делиться не более 50 раз, после чего в ней протекают необратимые процессы, ведущие к старению клетки (ткани, органа и всего организма в целом) и ее к гибели. При получении клонов путем пересадки ядер соматических клеток в энуклеированные яйцеклетки, возможно, что у такого организма будут протекать процессы жизнедеятельности в ускоренном биологическом темпе (на примере овечки Долли; рис. 15.3.), что приведет в конечном итоге, к наступлению преждевременной старости, а далее и к гибели. Только из этого противоречия видно, к сожалению, что наши знания еще столь ограничены, и мы не можем дать правильных ответов на многие вопросы, связанные с клонированием.

Для детального изучения вопросов, связанных с клеточными технологиями в животноводстве Вам поможет список рекомендуемой в этой главе изданий. В этом учебнике даются лишь общие представления о клонировании и описываются лишь общие принципы их получения.

В животноводческой практике используют два вида технологий по получению "конструированных" животных – это внутривидовое и межвидовое.

При внутривидовом "конструировании" получают клонированных, а при межвидовом – химерных животных.

В настоящее время различают два метода получения клонированных животных:

1. Метод дисекции предимплантационного эмбриона (рис. 15.4; 15.5.). Животные, полученные таким способом, называются монозиготными близнецами-ми.

2. Метод пересадки ядра, изолированного из соматической клетки в энуклеированную яйцеклетку (Метод энуклеации ядер соматических клеток и пересадка их в пустую ZP; рис. 15.3.).

Метод дисекции предимплантационного эмбриона. В основе получения монозиготных животных лежит явление *тотипотентности* (способность каждого бластомера при изолировании от эмбриона дать жизнеспособное потомство), а основой для получения клонов таким методом послужила естественная биологическая особенность животных – рождение однояйцевых близнецов.



Рисунок 15.4. Клонированные телята.

Первые монозиготные животные среди сельскохозяйственных животных получены в 1979 г. у овец путем разделения 2-х бластомерных эмбрионов. Методика по получению монозиготных животных состоит из следующих процедур (рис. 15.6; табл. 15.2.):

1. Извлечение из гениталий самки-донора эмбрионов на ранних стадиях дробления (2 - 8-ми бластомерные).

2. Удаление зоны пеллюцида. Различают два способа удаления зоны пеллюцида: 1) механическое разделение, что осуществляется под микроманипуляторным устройством; 2) ферментативное воздействие с помощью фермента проназы. Во втором случае эмбрионы переносят в раствор проназы, через 3 - 4 минуты ZP сжимается и истончается, после чего эмбрионы помещают для промывки в подготовленную микрокаплю M2+БСА.

3. Разделение эмбриона на отдельные бластомеры. Освобожденный от ZP эмбрион помещается в безкальциевую среду M2+БСА с целью разделения микроманипулятором. После разделения бластомеры помещаются для культивирования *in vitro* с целью регенерации в подготовленную микрокаплю M2+БСА при 37°C в атмосфере с 5% - CO₂ под маслом на 10 - 20 минут. При этом изолированные бластомеры становятся очень липкими, склеиваются и прилипают к дну инкубационных чашек, поэтому для культивирования каждую бластомеру помещают по отдельности в специальные неадгезивные чашки Петри.

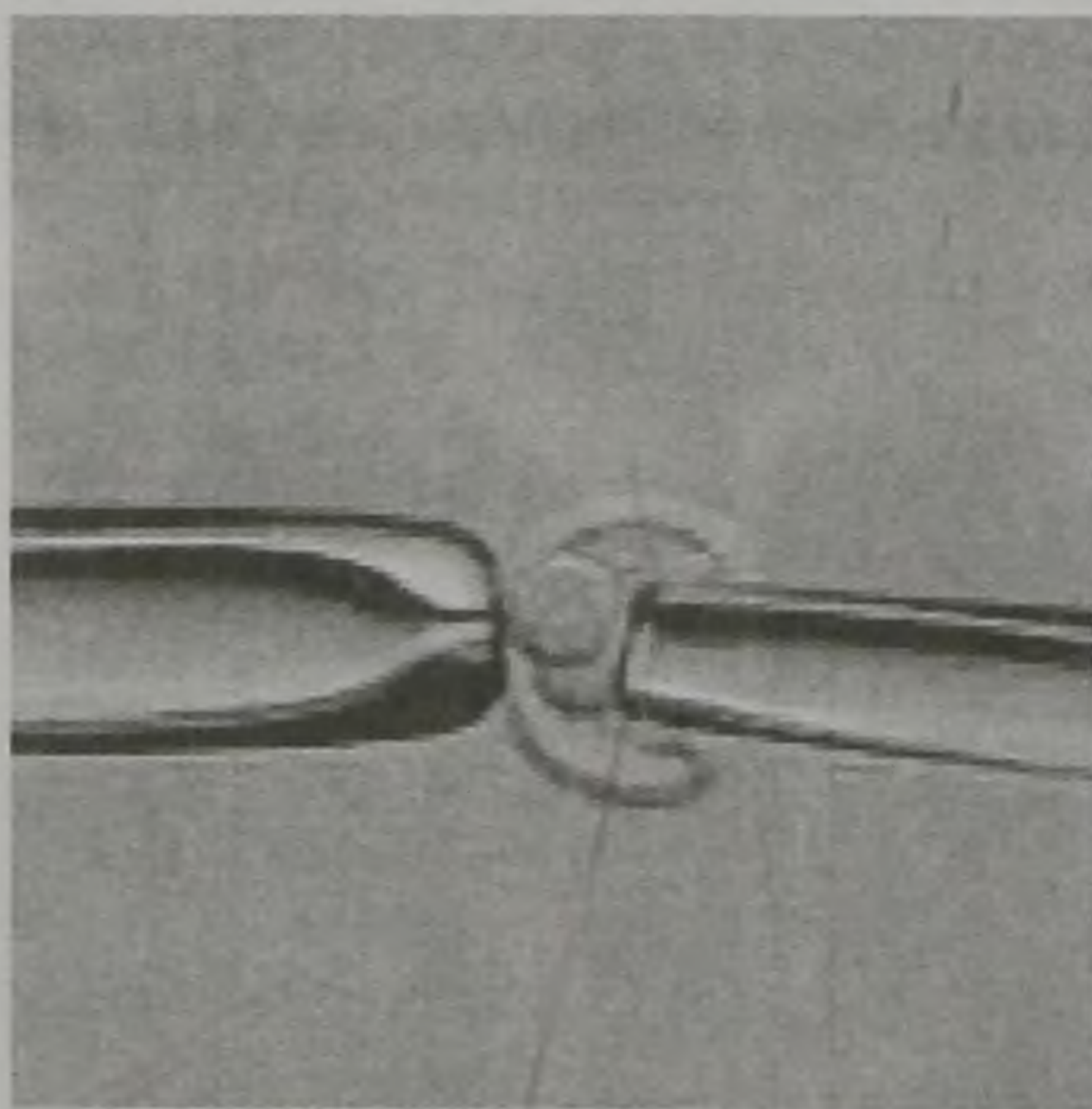


Рисунок 15.5. Метод бисекции (дисекции) эмбриона.

4. Инъецирование выделенных бластомеров в знуклеированную яйцеклетку (яйцеклетка с удаленным ядром), при этом периветеллиновое пространство заполняется сывороткой крови.

5. Введение конструированного эмбриона в небольшой цилиндр агара. Агар практически нерастворим в половом тракте самки и закупоривает любые отверстия в зоне пеллюцида, позволяя таким образом эмбриональным клеткам выжить и развиваться *in vivo*.

6. Культивирование *in vivo*. Эмбрион с агаром вводят в лигатированный яйцевод промежуточного реципиента.

В качестве промежуточных реципиентов для культивирования реконструированных эмбрионов используют овец. Наблюдения показали, что в лигатированном яйцевом тракте овцы создаются благоприятные условия для развития реконструированных эмбрионов коров, свиней и овец вплоть до стадии экспандированной бластоцисты. При этом овцематок-реципиентов желательно использовать с синхронизированной с самкой-донором охотой.

Таблица 15.2. Этапы работ по эмбриоинженерии на клеточном уровне в животноводстве

№	Этап работы	Последовательность процедур	Методика
1	Получение эмбриона	Суперовуляция самок-доноров	С помощью гормонов репродукции индуцируют у самки суперовулированный фолликулогенез. Параллельно подготавливают методом синхронизации самок – реципиентов.
		Осеменение	Осеменяют индуцированных самок дважды с интервалом 10 - 12 часов.
		Вымывание эмбрионов	Эмбрионы на стадиях 2 - 8 бластомер вымывают на второй-третий день индуцированного цикла. Эмбрионы на стадии морулы вымывают на 5 - 6 день, бластоцисты – на 6 - 7 день цикла.
		Оценка, селекция и отбор	Отбирают для микротехнологий только биологически полноценные эмбрионы, отнесенные к классу «отличные».
2	Микрохирургия на уровне эмбриона	Подготовка камеры и микроинструментов	Для микроклеточных технологий пользуются микроманипулятором. Микроинструменты готовят в микрокузницах.
		Подготовка энуклеированных яйцеклеток	Из Граафова фолликула выделяют ооциты. Из ооцита методом микрохирургии удаляют ядро. В микрокаплю №1 подготавливают по 1 штуке энуклеированный ооцит.

		Клонирование	<p>При пересадке ядер, последние выделяются из соматических клеток и переносятся в энуклеированные яйцеклетки.</p> <p>При бисекции изолированные из ZP бластомеры по одному инъецируются в энуклеированную яйцеклетку. В данном случае используются эмбрионы на стадии 2 - 8 бластомер.</p> <p>При создании химер используются эмбрионы на стадиях морулы (агрегационный метод) или бластоцисты (инъекционный метод).</p>
3	Трансплантация эмбриона	Культивирование	После микрохирургии эмбрионы собирают в микрокапли M16+BCA при 37°C и 5%-CO ₂ и культивируют в инкубаторе 18 - 24 часа (реанимационная культивация).
		Оценка, селекция и отбор	Биологически полноценными будут считаться эмбрионы, которые продолжили свое развитие <i>in vitro</i> .
		Пересадка эмбриона	Для пересадки с целью обеспечения синхронности между стадией развития эмбриона и стадией развития матки используют синхронизированных с донором реципиентов.
4	Изучение роста и развития	Цитогенетические, биохимические и селекционные методы	Изучают биологические критерии развития по полученному потомству в сравнении с контрольной группой.

Эмбрионы культивируют до образования ранней бластоцисты. После чего, методом лапаротомии бластоцисты извлекают из яйцевода, удаляют агар и производят оценку эмбриону.

7. Пересадка сконструированных биологически полноценных эмбрионов в ипсилатеральный рог самки - реципиента.

Таким образом, успех в получении монозиготных близнецов зависит от правильного удаления зоны пеллюцида и от эффективности инкубационного периода после микрохирургического вмешательства на целостность эмбриона.

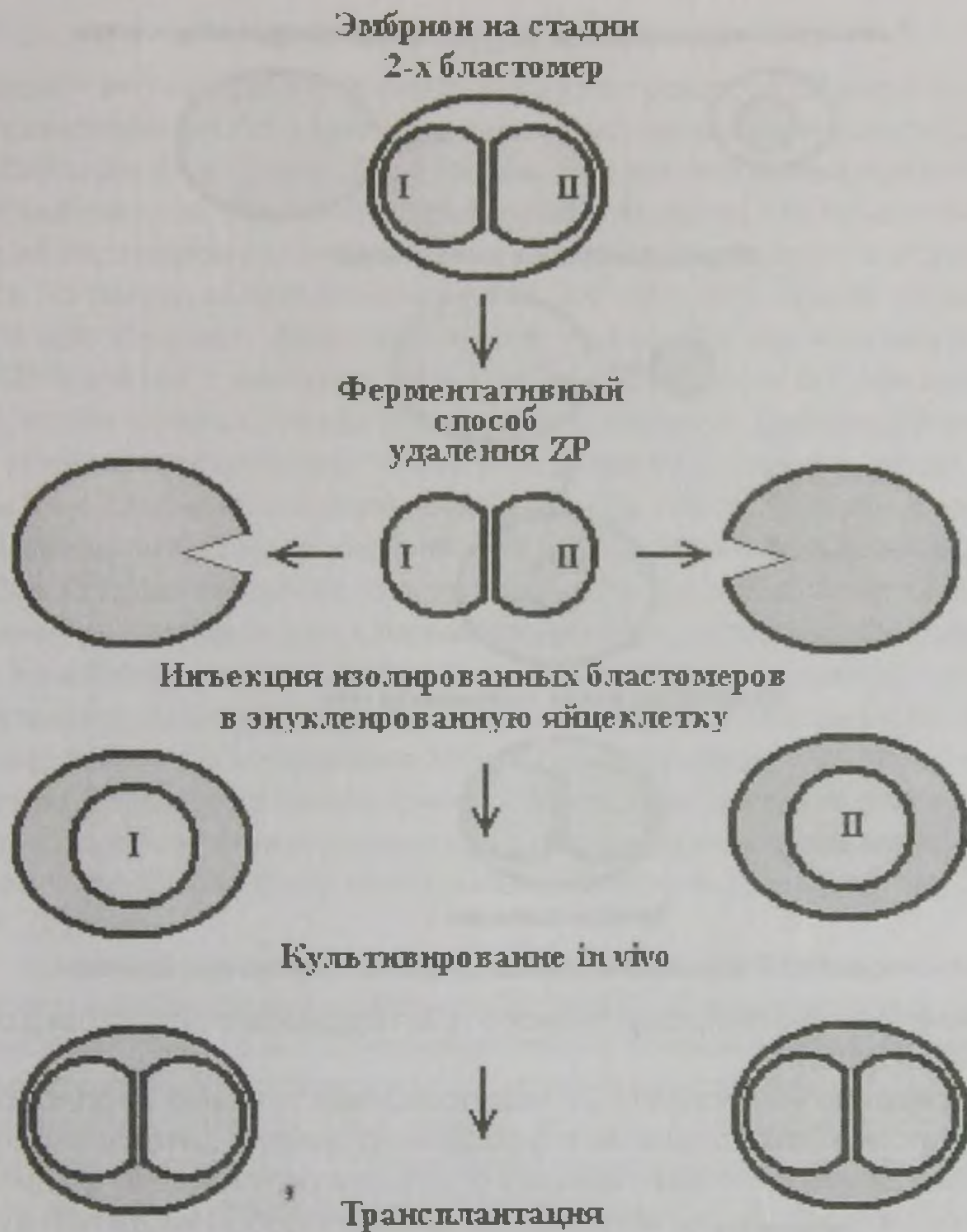


Рисунок 15.6. Упрощенная схема получения монозиготных животных.

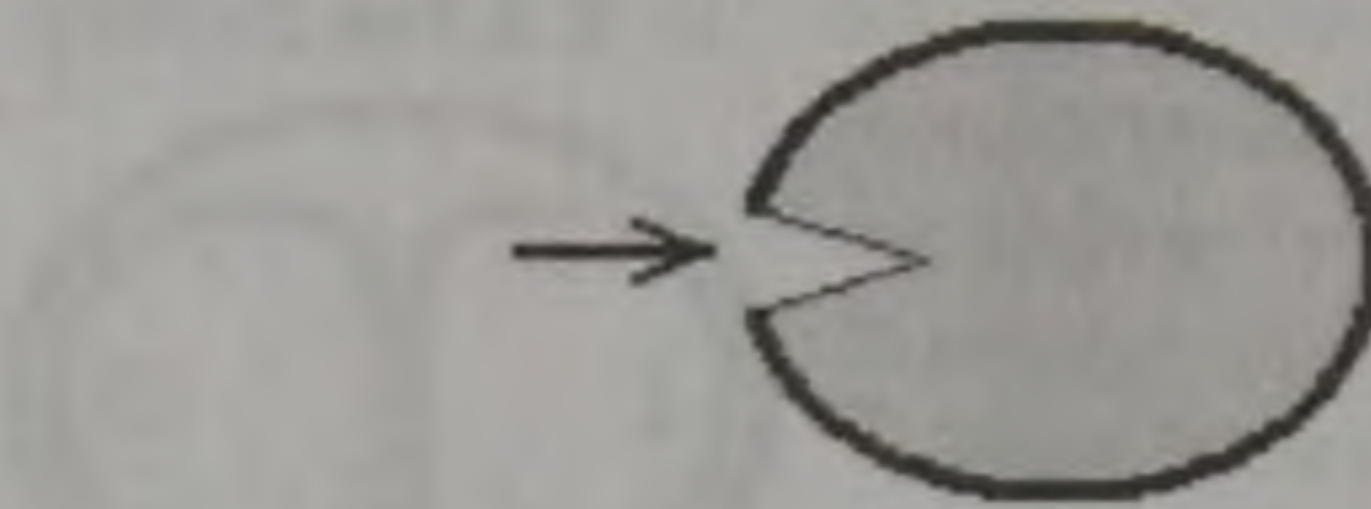
Как было рассмотрено выше, для эмбрионов большинства животных после компактизации морулы защита со стороны ZP несущественна. Поэтому последующие разработки по получению монозиготных животных были направлены на использование поздних морул и бластоцист. В этом случае эмбрионы разделяют на две равные части одновременно с разрезом ZP. В таком состоянии эмбрионы пересаживают в генитальный тракт реципиентов.

Метод энуклеации ядер соматических клеток и пересадка их в пустую ZP. Биологические копии из единичного организма можно получать, используя технику пересадки ядер выделенных из соматических клеток (можно и эмбриональных) в энуклеированную яйцеклетку (рис. 15.7.). Животные, полученные таким способом, называются *клонированными*.

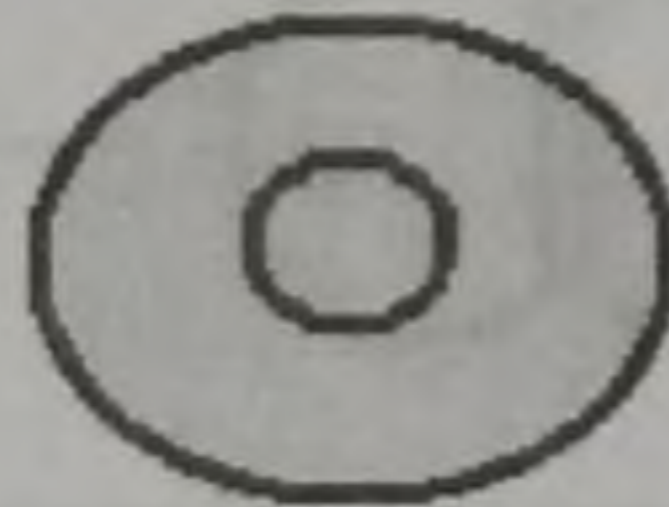
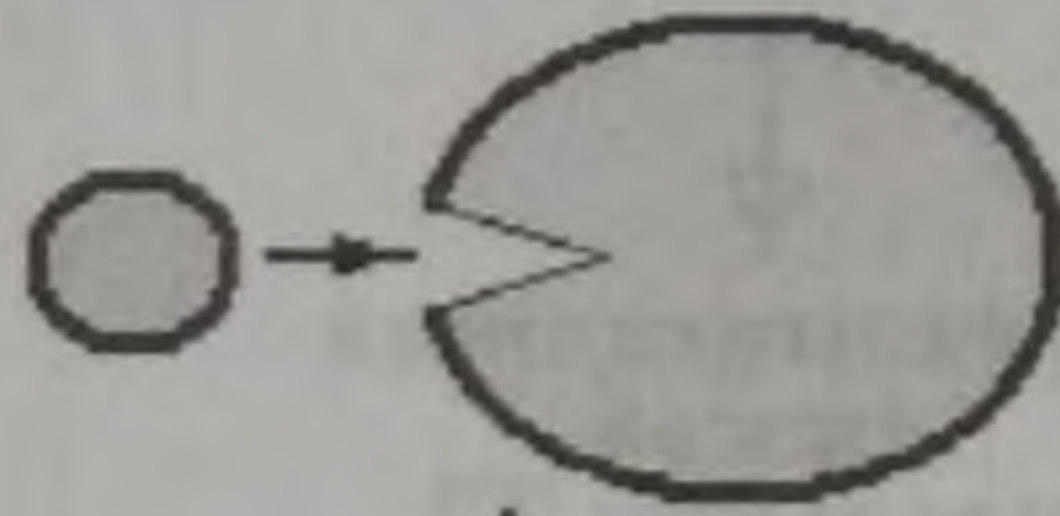
Методика получения клонированных животных состоит из следующих процедур (табл. 15.2.):

Соматическая клетка

Энуклеированная яйцеклетка



Пересадка соматического ядра



Культивирование эмбриона *in vivo*



Трансплантация

Рисунок 15.7. Упрощенная схема получения клонированных животных.

1. Извлечение из репродуктивного тракта донора и подготовка овулировавшей яйцеклетки.
2. Разрезание микроиглой ZP под полярным тельцем неоплодотворенной яйцеклетки и помещение ее в фосфатную среду с цитохалазином.
3. Отсасывание пипеткой полярного тельца и окружающую ее цитоплазму через час после начала культивирования. Таким способом яйцеклетка разделяется на две части с интактными клеточными мембранами, каждая из которых содержит цитоплазму. Та половина, которая удаляется с полярным тельцем, содержит хромосомы на стадии метафазы II ("ядерные" половинки яйцеклеток), тогда как другая половинка не содержит ядерные структуры ("энуклеированные" половинки яйцеклеток). При этом большая часть цитоплазмы остается в энуклеированных яйцеклетках (примерно 80 - 90% от первоначального объема).
4. Помещение ядер, выделенных из соматической клетки (или бластомера эмбриона) животных в "энуклеированную" яйцеклетку.
5. После электрослияния ядра с цитоплазмой эмбрионы помещают в фосфатный буфер при комнатной температуре.
6. Заключение эмбрионов в агар по вышеизложенной методике.
7. Культивирование *in vivo*. Эмбрионы пересаживают в лигатированные яйцеводы промежуточного реципиента и инкубируют их в течение 4 - 6-ти дней.
7. Извлечение эмбрионов и оценка их на биологическую полноценность.
8. Пересадка "конструированного" эмбриона постоянным реципиентам.

15.4. Химерные животные

Химера – это животное, произошедшее в процессе объединения бластомер, происходящих более чем от одного эмбриона. Химеры создаются путем комбинации бластомер, выделенных от двух или более предимплантационных эмбрионов. Опыты проводят таким образом, что генетический пол каждого из партнеров заранее не определяется, а это ведет к образованию мозаиков по половым хромосомам (XX + XX; XX + XY). Среди генетических мозаиков преобладают фенотипические самцы. Так как наличие в зачатке гонады 30% клеток с набором XY – половых хромосом вполне достаточно для того, чтобы зачаток гонады развивался в тестикул. Дифференциация химерных гонад в направлении тестикул возможно в случаях, когда клетки с набором XX и XY хромосом перемешаны между собой. Если же в зачатке гонады химерных эмбрионов сохраняются относительно большие территории между XX и XY бластомерами, то в этих районах происходит гистогенез, присущий яичнику, что приводит к гермафродитному развитию. Описан случай, когда на одной стороне у мышей развивался яичник, а на другой – семенник. Следовательно, пути дифференциации закладки гонады зависят не только от количественного соотношения XX и XY соматических клеток, но и от того, занимает ли каждый из этих клеточных клонов значительные районы в зачатке гонад или эти клеточные клоны равномерно перемешаны между собой.

Более подробный обзор химер млекопитающих дан в работах З.Макзарена и Н. Доурина.

При создании химер используют два метода: 1) агрегационный, который основан на объединении двух или более бластомеров разных генотипов в один эмбрион (рис. 15.8.); 2) инъекционный, основанный на введении в полость бластоцисты бластомеров из другого эмбриона (рис. 15.9.).

Агрегационный метод. При данном методе используют эмбрионы разных генотипов на стадии 8 - 12 бластомер. Нежелательно использовать эмбрионы как на более ранних стадиях развития из-за плохой адгезии (механическое объединение в единый функционирующий комплекс), так и на более поздних стадиях развития из-за лимитированного времени для культивирования *in vitro* перед пересадкой и имплантацией в матку.

Методика по получению химерных животных агрегационным методом состоит из следующих процедур:

1. Извлечение из гениталий самки-донора эмбрионов на ранних стадиях дробления (8 -ми- 12 -ти бластомерные). После получения двух эмбрионов разных генотипов их промывают в 1мл среды M16+BCA (pH 7,4 при 37°C, осмолярность 285 - 290 миллиОсмолей) под маслом в пластиковой чашке.

2. Удаление зоны пеллюцида по вышеизложенной методике.

3. Объединение двух эмбрионов путем помещения их в микрокаплю M16+BCA и культивирование их *in vitro* при 37°C в атмосфере с 5% - CO₂ под маслом. В течение дня эмбрионы 2 - 3 раза с помощью пипетки сближают друг к другу для осуществления агрегации. Инкубируют в течение 24 - 48 часов до завершения агрегации, т.е. до образования бластоцисты.

4. Трансплантируют химерные эмбрионы в гениталии маткам-реципиентам.

Теоретически агрегационные химеры можно получить не только путем объединения двух эмбрионов, но и трех и более. При этом масса химерных эмбрионов из-за механизма эмбриональной регуляции не становится больше обычного.

Инъекционный метод. При данном методе используют эмбрионы, находящиеся на стадии бластоцисты.

Методика по получению химерных животных инъекционным методом состоит из следующих процедур (рис. 15.10.):

1. Извлечение из гениталий самки-донора эмбрионов на стадиях бластоцисты. После получения двух эмбрионов разных генотипов их промывают в 1 мл среды M16+BCA (pH 7,4 при 37°C, осмолярность 285 - 290 миллиОсмоль) под маслом в пластиковой чашке.

2. Удаление ZP донорских бластоцист проназой.

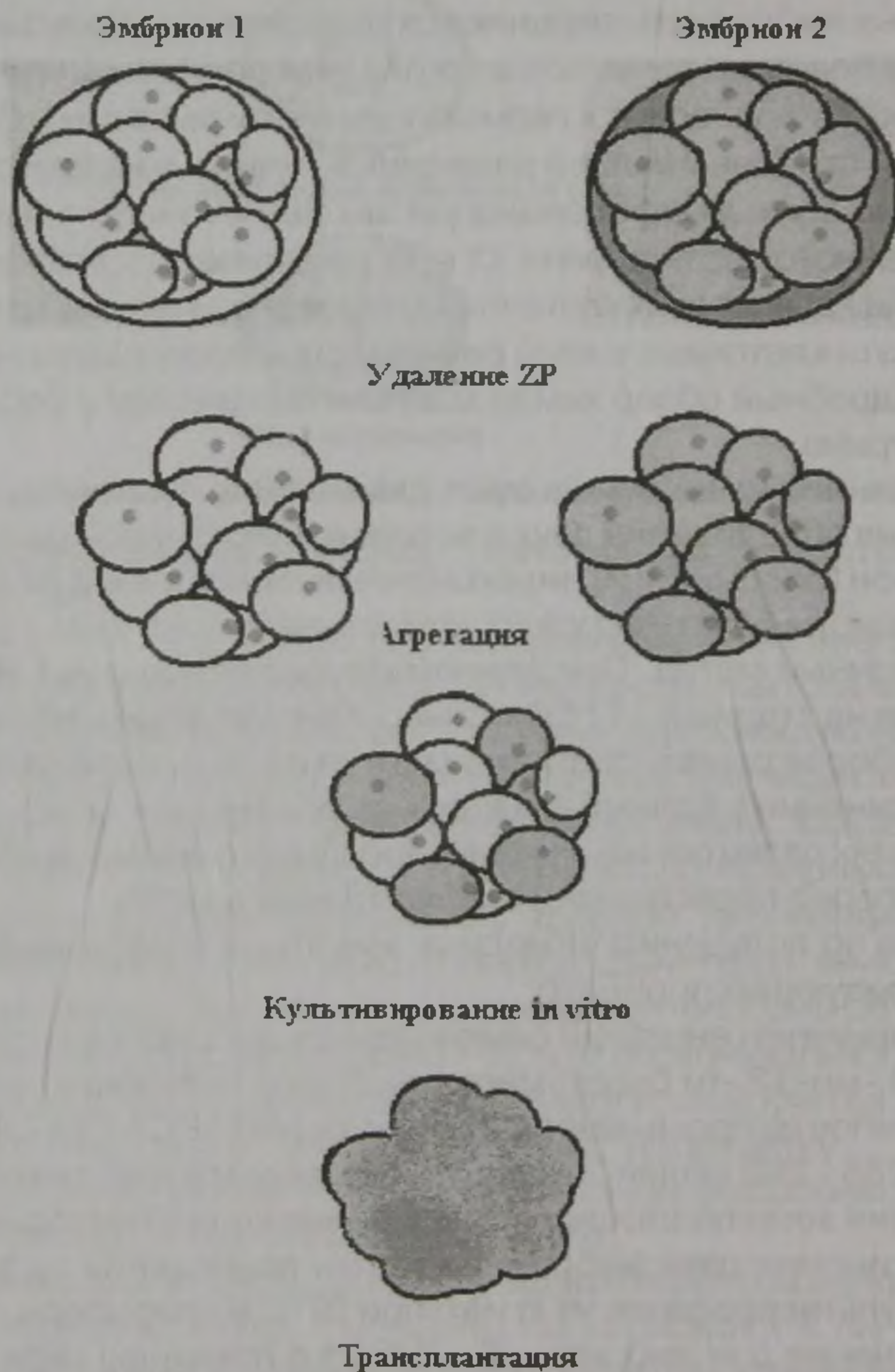


Рисунок 15.8. Упрощенная схема получения химерных животных агрегационным методом.

3. Культивирование *in vitro*. Донорские эмбрионы без ZP культивируют при температуре 37°C в течение одного часа (в качестве культуральной капли можно использовать сыворотку морской свинки или кролика).

4. Осторожное удаление лигированных клеток трофобласта (рис. 15.9.) отсасыванием микропипеткой. Изолированный эмбриобласт загружают в микропипетку.

5. Инъекция бластимеров, выделенных из эмбриона - донора в эмбрион - реципиент. Для этого удерживают эмбрион - реципиент микропипеткой с внешним диаметром 125 мкм. Полярный трофобласт прокалывают иглой и делают отверстие, через которое в бластоцель инжектируют пипеткой (внутренний диаметр которого равен 12 - 15 мкм) ВКМ от эмбриона-донора. Чем позже стадия развития эмбриона, от которой взята ВКМ для инъекции в бластоцель, тем меньше вероятность получения химер.

6. Культивирование химерного эмбриона *in vitro* в течение 12 часов.

7. Трансплантация химерного эмбриона в генитальный аппарат самки-реципиента.

Этот метод, по сравнению с агрегационным методом, хотя и более трудоемкий, имеет некоторые преимущества:

1) не требует удаления ZP, поэтому может быть применен в получении химер у животных, которые не способны развиваться без ZP (эмбрион кролика);

2) не возникает препятствия для имплантации при некоторых межвидовых комбинациях, для которых отторжение чужеродного бластомера обычно, поэтому данный метод применяют для получения межвидовых химер;

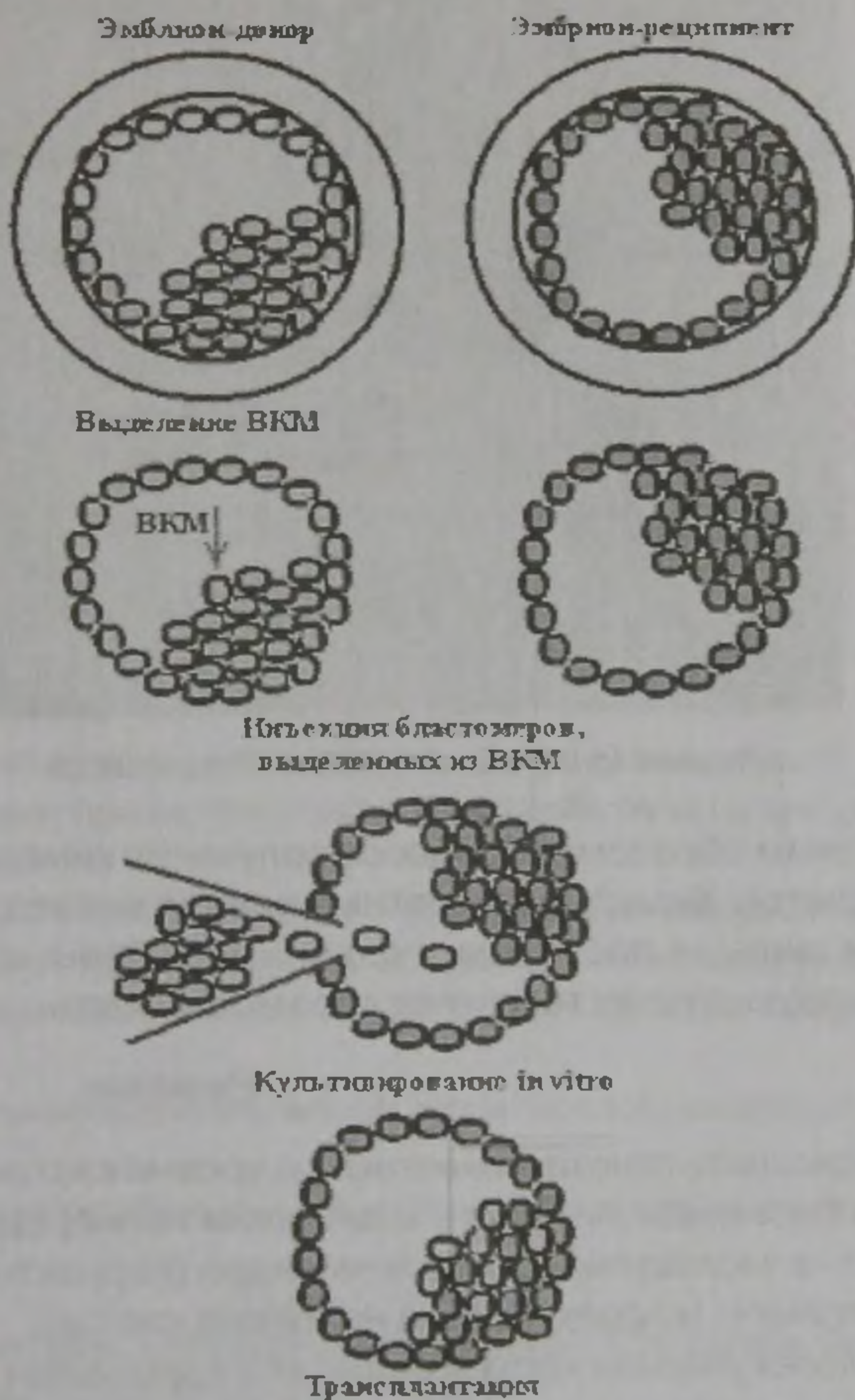


Рисунок 15.9. Упрощенная схема получения химерных животных инъекционным методом.

3) появляется возможность анализирования судьбы более поздних эмбриональных стадий развития при инъекции маркированных клеток.

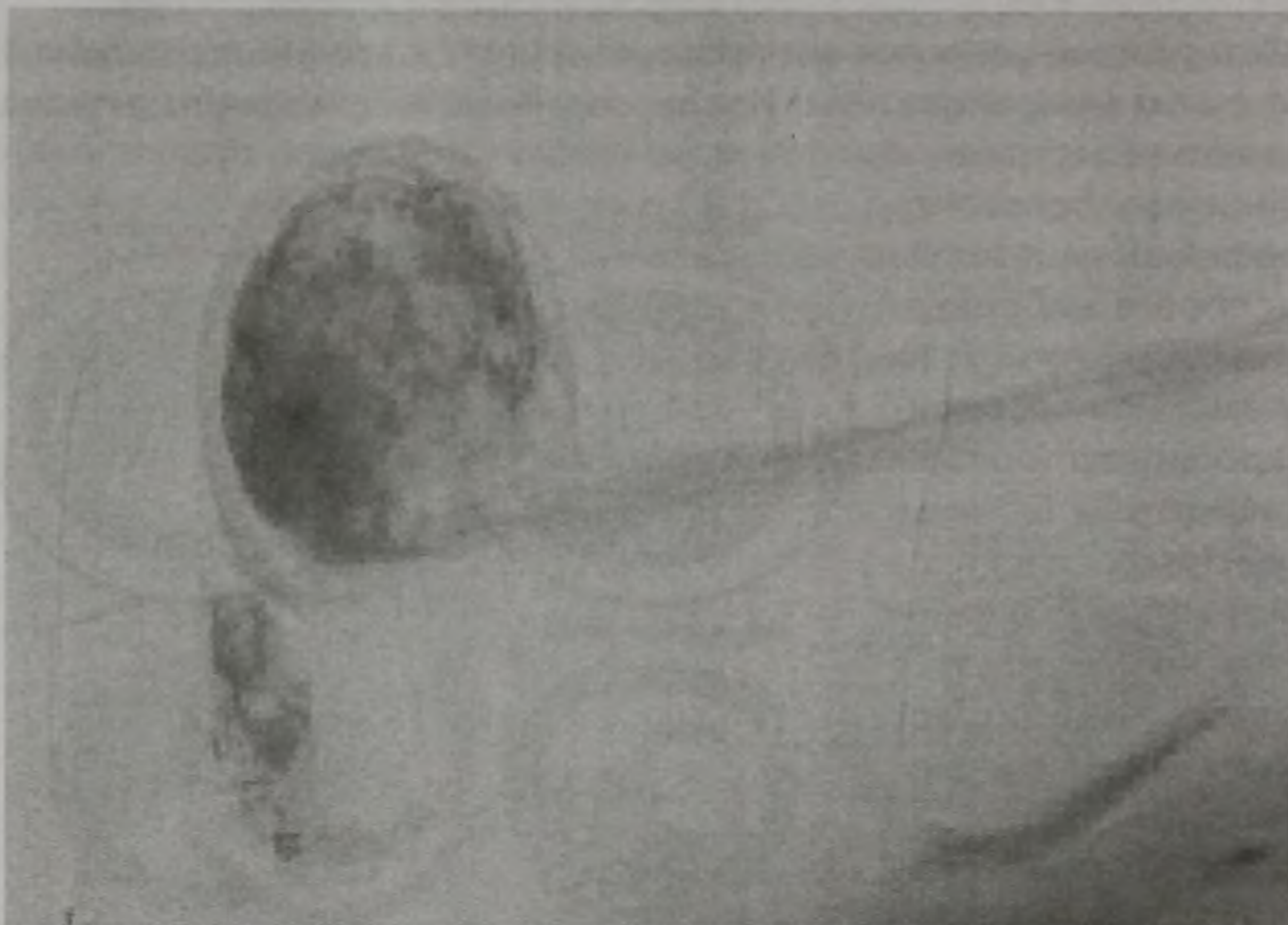


Рисунок 15.9. Удаление ВКМ из бластоцисты.

Таким образом, в процессе получения химер не происходит гибридизации клеток. Химерные животные поддерживают хозяйственно важные признаки лишь на протяжении одного поколения и не передают потомкам характерную для них генетическую мозаичность.

Резюме

Изменить генотип животных на уровне клеток репродукции можно методами биотехнологии при воздействии непосредственно на ДНК (корректировка на молекулярном уровне), ядро (корректировка на уровне ядра) или бластомеры (корректировка на уровне клеток).

Молекулярная корректировка предполагает применение рДНК для получения методом трансгеноза трансгенных животных. При ядерных микроманипуляциях производят перенос ядер, выделенных из соматических клеток, в энуклеированные яйцеклетки с целью получения клонированных животных. Микроманипуляции на уровне всей клетки осуществимо при воздействии на эмбрионы, когда получают либо монозиготных животных, что возможно при использовании метода бисекции (дисекции), либо химерных животных, что возможно при объединении бластомер, принадлежащих разным генотипам.

Особенностью данных технологий является то, что если при трансгенозе меняется генетическая программа клетки, а в будущем и всего организма

животных, то во втором и третьем – биологическая программа (биокопирование). Генетическая программа клетки меняется благодаря трансгенозу при успешной интеграции рДНК, которая обязательно должна сопровождаться, в дальнейшем, его экспрессией и, в результате, трансгенный организм приобретает такие возможности, которые первоначально генетически не были запрограммированы. Изменение биологической программы означает изменение биологических принципов развития животных, что осуществимо при клонировании.

Ключевые слова и понятия:

Агрегационный метод

Биокопирование

Генетическая мозаика

Инъекционный метод

Клон

Клонирование

Клонированные животные

Монозиготные животные

Трансген

Трансгенное животное

Трансгеноз

Трансплантация ядер

Химерные животные

Энуклеация

Контрольные вопросы:

1. На каких уровнях можно воздействовать на эмбрионы животных?
2. Каких животных получают при молекулярном воздействии на эмбрионы?
3. Каких животных получают при ядерном воздействии на эмбрионы?
4. Каких животных получают при клеточном воздействии на эмбрионы?
5. Какими биологическими особенностями обладают трансгенные животные?
6. Какими биологическими особенностями обладают клонированные животные?
7. Какими биологическими особенностями обладают химерные животные?

Рекомендуемая литература. Вопросы, касающиеся этой главы, очень хорошо и подробно изложены в следующих работах:

1. Barton S C Adams C. A., Norris M. L., Surani M. A. H. (1985). *J. Embryol.*
2. Barton S. C., Surani M. A. H. (1983). *Exp. Cell Res.*, 146, 187.
3. Barton S. C., Surani M. A. H., Norris M. L. (1984). *Nature*, 311, 374.
4. Belmont J. W., Henkel-Tigges J., Chang S. M. W., Wager-Smith K., Kel-lems R. E., Dick J. E., Magli M. C., Phillips R. A., Bernstein A., Caskey C. T. (1986). *Nature*, 322, 385.
5. Brinster R. L., Chen H. Y., Trumbauer M. E., Yagle M. K., Palmlter R D. (1985). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82, 4438.
6. Brinster R. L., Chen H. Y., Warren R., Sarthy A., Palmlter R. D. (1982) *Nature*, 296, 39.

7. Chada K., Magram L, Raphael K., Radice G., Lacy E., Costantini F. (1985) *Nature*, 314, 377.
8. Chapman V. M., Whitten W. K., Ruddle F. H. (1971). *Dev. Biol.*, 26, 153.
9. Covarrubias L, Nishida Y, Mintz B. (1986). *Proc. Natl. Acad. Sc. USA*. 83, 6020.
10. Cuthbertson K. S. R. (1983). *J. Exp. Zool.*, 226, 311.
11. Eglitis M. A. (1980). *J. Exp. Zool.*, 213, 309.
12. Feinberg A. P., Vogelstein B. (1984). *Anal. Biochem.*, 137, 266.
13. Gardner R. L. (1978). In: *Methods in Mammalian Reproduction*. Daniel J. C. (ed.), Academic Press, New York, p. 137.
14. Gilles R. E., Ruddle R. H. (1973). *In Vitro*, 9, 103.
15. Gridley T., Soriano P., Jaenisch R. (1987). *Trends Genet.*, 3, 162.
16. Harris H., Catkins L F. (1965). *Nature*, 205, 640.
17. Jaenisch R., Jaehner D., Nobis P., Simon L, Loehler L, Harbers K-, Grotkopp D. (1981). *Cell*, 24, 519.
18. Joyner A., Keller G., Phillips R. A., Bernstein A. (1983). *Nature*, 305, 556.
19. Kaufman M. H. (1983). *Early Mammalian Development: Parthenogenetic Studies*. Cambridge University Press, Cambridge.
20. Kaufman M. H. (1978). In: *Methods in Mammalian Reproduction*. Daniel J. C. (ed.), Academic Press, New York, p. 21.
21. Kaufman M. H. (1982). *J. Embryol. Exp. Morphol.*, 71, 139.
22. Koenig M., Hoffman E P., Bertelson C. L, Monaco A. P., Teener C., Kun-ke L. M. (1987). *Cell*, 50, 509.
23. Kubiak LZ., Tarkowski A. K. (1985). *Exp. Cell Res.*, 157, 561.
24. Kuehn M., Bradley A., Robertson E., Evans M. (1987). *Nature*, 326, 295.
25. Lathe R., Vilotte LL., Clark J. (1987). *Gene*, in press.
26. Maniatis T., Fritsch E. F., Sambrook J. (1982). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
27. McGrath J., Solter D. (1984). *Science*, 226, 1317.
28. Michiels F., Burmeister M., Lehrach H. (1987) *Science*, 236 1305
29. Neff J. M., Enders J. F. (1968). *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 127, 260.
30. Palmlter R. D., Brinster R. L. (1986). *Annu. Rev. Genet.*, 20, 465.
31. Relk W., Willams G., Barton S. C., Norris M. L., Neuberger M., Surani M. A. H. (1987). *Eur. J. Immunol.*, 17, 465.
32. Robertson E., Bradley A., Kuehn M., Evans M. (1986). *Nature*, 323, 445.
33. Sanes J. R., Rubenstein J. L. R., Nicolas J. F. (1986). *EMBO J.*, 5, 3133.
34. Sealey P. G., Southern E. M. (1982). In: *Gel Electrophoresis of Nucleic Acids — A Practical Approach*. Rickwood D. and Hames B. D. (eds.), IRL Press, Oxford, p. 39.
35. Shimotohno K., Temin H. M. (1981). *Cell*, 26, 67.
36. Soriano P., Cone R., Mulligan R., Jaenisch R. (1986). *Science*, 234, 1409.
37. Soriano P., Jaenisch R. (1986). *Cell*, 46, 19.
38. Spindle A. (1981). *Exp. Cell Res.*, 131, 465.
39. Stewart C. L., Schuetze S., Vanek M., Wagner E. F. (1987). *EMBO J.*, 6, 383.

40. Surani M. A. H., Barton S. C. (1983). *Science*, 222, 1034. 18 Surani M A H., Barton S. C., Norris M. L. (1984). *Nature*, 308, 548. 19. Mann J. R., Lovell-Badge R. H. (1984). *Nature*, 310, 66.
41. Surani M. A. H., Barton S. C., Norris M. L. (1986). *Cell*, 45, 127.
42. Whittingham D. G., Wales R. G. (1969). *Aust. J. Biol. Sci.*, 22, 1065.
43. Whittingham D. G. (1971). *J. Reprod Fert. (Suppl.)*, 14, 7.
44. Willadsen S. M. (1986). *Nature*, 320, 63.
45. Zimmermann V., Vienken J. (1982). *J. Membr. Biol.*, 67, 165.

СЛОВАРЬ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ ТЕРМИНОВ

Автоклав – прибор, в котором производится стерилизация паром под давлением.

Андрогамоны – гамоны сперматозоидов.

Антральный фолликул (вторичный фолликул) – это фолликул с антрумом, внутри которого содержится ооцит на стадии пахинемы профазы I мейоза.

Аптека лабораторная – это шкаф со многими ящиками и откидным столом, предназначенный для хранения медикаментов.

Асептика – способ борьбы с хирургической инфекцией, основанный на предупреждении попадания микробов в рану путем полного обеззараживания всех предметов, которые соприкасаются с раной.

Бактериофаг – это вирус, паразитирующий в бактериях.

Банк гена (библиотека генома) – это коллекция клонируемых молекул ДНК, включающая не менее одного экземпляра каждой последовательности генома.

Белки – это необходимые полимеры, которые вовлечены почти во все биологические функции.

Бикс – это металлическая никелированная коробка с плотно закрывающейся и застегивающейся крышкой, используемая для хранения стерильных инструментов и белья.

Биологическая полноценность гамет – это способность гамет осуществить оплодотворение с целью зарождения нового индивидуума.

Биологическая полноценность эмбрионов – это их нормальное развитие, которое обязательно должно закончиться рождением нового организма.

Биологическая сущность полового аппарата сводится к созданию и поддержанию первичных и вторичных половых признаков с целью обеспечения репродуктивной активности животных.

Биологическая сущность полового аппарата самцов животных заключается в образовании сперматозоидов и создании им благоприятных условий для развития, в выведении их из половых органов и введении в половые органы самок.

Биологическая сущность половой системы самок животных сводится к образованию и созреванию яйцеклеток, в получении через половой акт сперматозоидов и созданию благоприятных условий для успешного оплодотворения гамет, дальнейшего внутриутробного развития плода и его рождения с последующим кормлением в молочный период развития.

Биологически полноценные эмбрионы – это эмбрионы, оцененные по качеству, отнесенные к классу качественные и пригодные для пересадки.

Биотехнологический материал – это продукция, которую получают при вымывании эмбрионов из гениталий доноров.

Биотехнологический параметр воспроизводства – это показатели, получаемые от самки донора при вымывании эмбрионов и показатели, получаемые от реципиентов при пересадке эмбрионов.

Биотехнологический резерв – это выявление и использование генетического резерва для биотехнологических целей.

Биотехнология – это наука, которая с помощью научных и технических принципов «корректирует» биологическую систему в гуманных для человека целях.

Биотехнология воспроизводства животных – метод использования репродуктивного резерва животных для их ускоренного размножения с целью улучшения генетического потенциала.

Биотехнология животных – это наука, которая с помощью методов молекулярной и клеточной биотехнологии производит «корректировку» генотипа, обеспечивая создание скороспелых резистентно стойких и высокопродуктивных животных.

Биотехнология клеточная – это наука, которая занимается различными клеточными микроманипуляциями, в результате которых получают организмы с ценными биологическими свойствами.

Биотехнология молекулярная – это наука, с помощью которой осуществляется «коррекция» наследственности на молекулярном уровне с целью получения новых генетических программ в животном организме.

Брюшистый скальпель – это хирургический инструмент, который предназначен для поверхностного неглубокого разреза.

Вектор – это естественный репликон небольших размеров.

Вектор – это фрагмент ДНК прокариот или ДНК вируса в составе рДНК, который выполняет функцию «молекулярного такси», так как является переносчиком чДНК, обеспечивая механизм репликации и экспрессии.

Виварий – это помещение, где размещаются лабораторные животные.

Витальный метод – это метод изучения репродуктивных клеток и эмбрионов животных без ущерба их жизнедеятельности.

Вителлогенез – период большого роста, характеризуется резкой интенсификацией цитоплазмы, что ведет к изменению ядерно-цитоплазматического соотношения, т.е. это трофоплазматический рост.

Влагалище – это орган совокупления и вывода плода, который представляет собой довольно длинную трубку от преддверия до влагалищной части шейки матки.

Влагалищное зеркало – инструмент, предназначенный для исследования влагалища и влагалищной части шейки матки.

Вторичная структура белка – это пространственная организация полипептидного остова белковой молекулы.

Вымывание эмбрионов – это метод, обеспечивающий с помощью питательных сред извлечение эмбрионов из органов репродукции (фаллопиевой трубы и матки).

Гаметогенез – это период собственного развития половых клеток, процесс превращения диплоидных первичных половых клеток в гаплоидные дифференцированные женские (яйцеклетка) или мужские (сперматозоид) половые клетки.

Гамоны – это химические вещества, косвенно участвующие в обеспечении их сближения и взаимодействия.

Ген – это строгий порядок дезоксирибонуклеотидов, который определяет информационное содержание индивидуального генетического элемента.

Гиалоплазма объединяет различные структуры клетки и обеспечивает их взаимодействие.

Гиногамоны – это гамоны яйцеклеток.

Граафов фолликул – это фолликул, внутренняя полость которого содержит большой антрум и ооцит на стадии метафазы II мейоза.

Дезоксирибонуклеотид - структурная единица молекулы ДНК, состоящая из трех компонентов: пятиатомный углерод дезоксирибоза, пуриновое (А, G) или пиримидиновое (С, Т) азотистое основание и фосфорная группа.

Дистиллятор – прибор, позволяющий получать дистиллированную воду.

ДНК – это двухцепочечный правильной формы спиралеобразный полимер, цепи которых закручены одна вокруг другой и вокруг общей оси.

ДНК – это молекула, ответственная за установление и поддержание клеточных и биохимических функций организма.

Донор – это самка, от которой получают генетически ценные ооциты и эмбрионы.

Дробление – это разделение зиготы на бластомеры

Желтое тело – это тело формируется после овуляции из клеточных компонентов фолликула.

Зигота – это оплодотворенная яйцеклетка. Различают две стадии развития зиготы: стадия двух пронуклеусов (до кариогамии) и стадия зрелой зиготы (после кариогамии).

Ипсилатеральная сторона – это та сторона яичника, в которой произошла овуляция.

Искусственное осеменение – это мероприятие, направленное на использование семени высокопродуктивных производителей для поголовного покрытия самок с целью масштабного улучшения генотипа животных.

Капацитация – это реакция, благодаря которой сперматозоиды в гениталиях самки приобретают оплодотворяющую способность (под влиянием секретов, вырабатываемых стенками яйцеводов, матки и влагалища).

Кариогамия – это объединение ядерного материала обеих гамет.

Катетеры – это инструменты, используемые при искусственном осеменении и трансплантации эмбрионов.

Кетгут – это хирургическая нить, изготавливаемая из подслизистого слоя кишечника мелкого рогатого скота, обладающая свойством рассасывания в тканях животного организма и необходимая для соединения тканей.

Клетка – это ограниченная активной мембраной, упорядоченная, структурированная система биополимеров (белков, нуклеиновых кислот, липидов, углеводов и др.), участвующих в единой совокупности метаболических и энергетических процессов, осуществляющих поддержание и воспроизведение всей системы в целом.

Клеточная биотехнология – наука, осуществляющая микроманипуляции на уровне ядер и клеток с целью получения животных и растений с необычными и полезными для человека свойствами.

Клонирование – это процесс получения множественных копий от первоначальной единичной молекулы, клетки или особи.

Количественная биология – это применение популяционно-статистического метода при анализе массовых данных в области биологии.

Космида – это гибридная молекула ДНК, которая может жить двойной жизнью: их плазмидная часть дает возможность реплицироваться и проводить отбор в бактериальных клетках, а часть, которая принадлежит геному фага λ , обеспечивает их упаковку в оболочку фага и трансдукцию в реципиент за счет инфекционных свойств этого фага.

Криобиология – это раздел биологии, изучающий факторы воздействия низких и сверхнизких температур на биологические объекты.

Криоконсервация – это метод длительного хранения гамет и эмбрионов путем воздействия на них низких температур.

Криопротектор – это низкомолекулярный неэлектролит, способный проникать через мембрану клетки с целью предохранения их от повреждающего действия высоких концентраций растворов, которые создаются в результате замораживания воды в суспензионной среде.

Культивирование – это метод, в котором гаметы и эмбрионы помещаются в среду естественного или искусственного происхождения с целью обеспечения им условий для сохранения жизненных функций, а также созревания и развития.

Культивирование *in vitro* – это метод, в котором фолликулы или изолированные из них ооциты и эмбрионы помещаются в питательную среду с целью обеспечения им благоприятных условий для развития.

Культивирование эмбрионов *in vivo* – это метод, основанный на использовании «промежуточных» реципиентов.

Лаборатория научная – это помещение, в которой имеются все необходимые приборы, оборудования, инвентарь для проведения научного эксперимента по определенной тематике.

Лабораторные стаканы – тонкостенные цилиндры различной емкости, широко применяются в работах, связанных с приготовлением сред.

Ламинарный бокс – это приспособление, благодаря которому обеспечивается полная изоляция и стерильность при работе с гаметами и эмбрионами.

Лапаротомия – это вскрытие брюшной полости для осуществления доступа к органам репродукции.

ЛГ и ФСГ – это гликопротеины, состоящие из двух пептидных цепей – б-Ф- и в-Ф-субъединиц: б-Ф-цепи ЛГ и ФСГ практически идентичны, а в-Ф-цепи различны, что и обеспечивают биологическую специфичность их эффектов.

ЛГ обеспечивает овуляцию, формирование желтого тела и стимулирует функцию молочной железы во время лактации.

Лютеальная фаза – это фаза деятельности ЛГ гормона, который обеспечивает овуляцию.

Матка – это орган плодношения и состоит из трех отделов: шейки, тела и двух рогов – правого и левого.

Мерные цилиндры и мензурки – это стеклянные сосуды цилиндрической или конической формы, на стенке которых имеется шкала деления, необходимые при работах, связанных с эмбриокультуральными исследованиями, искусственном осеменении и трансплантации эмбрионов.

Микрокузница – это прибор, предназначенный для изготовления микроинструментов.

Микроманипуляционная система – оборудование, предназначенное для клеточных технологий.

Микроскоп серии МБС – прибор, предназначенный для оценки, селекции и отбора эмбрионов.

Минимальная среда – это среда, в составе которой существуют компоненты, сведенные до минимума и необходимые для поддержания жизни, роста и развития.

Молекулярная биотехнология – наука, изменяющая генетическую программу клетки на молекулярном уровне и основанная на технологии рекомбинантной ДНК.

На донора – это показатель усреднения биотехнологического параметра воспроизводства, получаемого от донора и указывающего на экономическую рентабельность.

Нехирургический метод трансплантации эмбрионов – это метод трансплантации эмбрионов, при котором осуществляется совокупность механических воздействий без нарушения целостности ткани при осуществлении доступа к гениталиям самок животных.

Норма овуляции – это генетически запрограммированное для полового цикла число овуляций с целью реализации репродуктивных качеств самки.

Нуклеотидная пара (н.п.) – это показатель характеристики длины двухцепочечной спирали ДНК (килооснование = 1000н.п.; мегаоснование + 1000000н.п.).

Овуляция – процесс выхода ооцита из созревшего фолликула.

Окситоцин – *гормон, необходимый для стимуляции активного выведения молока молочной железой и сокращения матки при родах.*

Операционный блок – место, где проводится операция.

Оплодотворение гамет – это процесс слияния сперматозоида с яйцеклеткой, который приводит при кариогамии к зарождению нового индивида путем образования зиготы.

Оплодотворенные ооциты – это ооциты, полученные от самок-доноров при экстракорпоральном оплодотворении или при осеменении, последующем вымывании и оценке.

Оплодотворяющая способность гамет – это продолжительность времени, в период которого гаметы могут оплодотвориться.

Органеллы – структуры цитоплазмы, выполняющие в клетке специфические функции.

Охота – положительная сексуальная реакция самки на самца.

Оценка гамет и эмбрионов – это мероприятие, основано на применении микроскопа и сводится к определению их биологической полноценности.

Первичная структура белка – это последовательность аминокислот, входящих в полипептидную цепь.

Пипетки и микропипетки – используют для отмеривания малых объемов жидкостей, емкостью 1,2,3,4, и 5 мл.

Питательная среда (культуральная среда) – это среда, обеспечивающая рост и развитие биологических систем благодаря наличию в своем составе компонентов, необходимых для нормальной жизнедеятельности клеток.

Питомник – это помещение, где животные временно содержатся для подготовки к эксперименту с целью выдержки их на голодной диете.

Плаزمид – это внехромосомальная кольцевая молекула ДНК, состоящая из 10 - 30 тыс. пар оснований и способная к автономной репликации.

Подготовка животного к операции – это система мероприятий, проводимых до операции с целью предупреждения осложнений.

Полимеразная цепная реакция (ПЦР) – это эффективная процедура для производства большого количества определенной последовательности ДНК in vitro.

Половая зрелость животного – это период, когда животные становятся половозрелыми, т.е. когда самец способен оплодотворить самку, а самка – забеременеть.

Половое возбуждение – самка проявляет «интерес» к самцу.

Половой цикл – это результат ритмической смены функционального состояния яичников и соответствующих изменений гормонального баланса.

Праймер – это короткий РНК - содержащий фрагмент в молекуле ДНК, необходимый для инициации репликации.

Преантральный фолликул (первичный фолликул) – это фолликул, внутри которого содержится ооцит на стадии диплономы профазы I мейоза, а снаружи – слой зернистых клеток с рецепторами к ФСГ, окруженный теком.

Превителлогенез – это период малого роста, т.е. цитоплазматический рост ооцитов, который начинается с момента вступления оогоний в мейоз и протекает на фоне его профазы.

Преддверие влагалища – это короткая мышечная трубка, начинающаяся от половой щели и заканчивающаяся у отверстия мочеиспускательного канала.

Пределы точности синхронизации – это показатель промежутка времени между половыми циклами донора и подготовленных к ним реципиентов, а также стадией развития матки со стадией развития эмбриона.

Предимплантационное развитие - это период развития, при котором зигота при одновременном перемещении по репродуктивному тракту от места оплодотворения (ампула фаллопиевой трубы) до места имплантации (рог или тело матки) проходит через ряд дроблений, ведущих к образованию бластулы.

Предметные и покровные стекла – плоские прямоугольной формы стеклянные предметы, необходимые для проведения работ по клеточной селекции.

Предоперационный период – это период, когда животное готовят к операции.

Придаток семенника – это орган, соединенный с задним концом семенника и необходимый для созревания сперматозоидов.

Приживляемость эмбрионов – это относительный показатель, указывающий на имплантацию эмбрионов в матке реципиентов в зависимости от общего числа их использования.

Прижившие эмбрионы – это эмбрионы, имплантировавшиеся в матку реципиента после их пересадки.

Пробирки – это узкие цилиндрической формы сосуды с закругленным дном, используемые в различных манипуляциях при эмбриокультуральных исследованиях.

Пробник – это самец, используемый для выведения самок в охоте.

Прогестерон – это гормон, подготавливающий слизистую оболочку матки к имплантации зародыша и далее – к его нормальному развитию.

Производитель – это самец, покрывающий самку-донор.

Пролактин – гормон, обеспечивающий выработку молока молочной железой.

Раздражимость – это способность клетки реагировать на внешний мир.

Размножение – это одно из основных свойств живого, благодаря которому происходит новообразование (рост) и обновление клеток.

Рекомбинантная ДНК (рДНК) – это сконструированная в условиях *in vitro* кольцевая молекула, состоящая из ДНК различного происхождения: рДНК = ДНК эукариот + ДНК прокариот (и/или ДНК вирусов).

Репликационная вилка – это разделенный участок ДНК, на которой происходит синтез ее дочерних цепей.

Репликация – биологический процесс, обеспечивающий удвоение молекулы ДНК.

Репликон – это самореплицирующийся генетический элемент.

Реципиент – это самка, вынашивающая чужой плод.

Рибосома – органоид, функционирующий как мини-фабрика, т.к. передвигаясь вдоль матрицы, осуществляет синтез пептидных связей.

Секвенирование – это метод определения нуклеотидной последовательности ДНК.

Селекция эмбрионов – это принципы сортировки, основанные на разделении эмбрионов на два класса: пригодные и не пригодные для трансплантации.

Семенники – это половые трубчатые железы овальной или округлой формы, расположенные в мошонке и вырабатывающие сперматозоиды и тестостерон.

Сильный промотор – это тот, который имеет высокую специфичность для РНК-полимеразы.

Синхронизация охоты – это мероприятие, в котором на группу самок оказывают гормональное воздействие с целью обеспечения для них одновременности проявления эструса.

Сперма – это жидкость, продуцируемая при эякуляции, которая состоит из сперматозоидов, секретов придатка семенника и придаточных половых желез.

Сперматозоид – эта мелкая, способная передвигаться гаплоидная клетка самцов животных, приспособленная к внедрению в яйцеклетку с целью активации и зарождения нового индивида путем восполнения видового наследственного материала.

Спермиоприемник – это стеклянный двустенный колоколообразный с цилиндрической пробиркой на конце сосуд, используемый для получения спермы.

Спермиопровод – это длинная трубка с многочисленными складками, в стенках которого имеются обильно разветвленные железы, выделяющие жидкий секрет, который смешивается со сперматозоидами во время эякуляции.

Стадия торможения – это обратное развитие морфологических и физиологических процессов, возникших в стадии возбуждения.

Стадия уравнивания – это относительный покой в поведении самки, но не в ее половом аппарате.

Стеклянные крючки, иглы, капилляры – имеют микроскопические размеры и изготавливаются на специальных приспособлениях – «микрокузницах», широко применяются в различных микрохирургических манипуляциях для оказания механического воздействия на клетки.

Стерилизационный блок – место, предназначенное для стерилизации инструментария.

Стерилизация – это процедура, основанная на уничтожении микробов и их спор на хирургическом белье, инструментарии и лабораторной посуде.

Суперовулированные ооциты – это ооциты, полученные от самок-доноров при воздействии на них экзогормонами.

Суперовулированный яичник – это яичник, в котором число дополнительных овуляций составит для одноплодных животных 3 и более, а для многоплодных – увеличится вдвое по сравнению с нормой овуляцией.

Суперовуляция – метод гормонального воздействия на самку-донор, обеспечивающий рост и развитие дополнительного числа фолликулов.

Суперовуляция (суперовулированный фолликулогенез) – это стимуляция роста и развития дополнительных фолликулов яичника в одном половом цикле при помощи экзогормонов.

Термостат – прибор, позволяющий поддерживать температуру на одном уровне.

Термостат-инкубатор – прибор, предназначенный для культивирования гамет и эмбрионов и предоставления гаметам условий для успешного оплодотворения.

Течка – процесс сильной гиперемии половых органов, набухания слизистой оболочки и усиленного функционирования желез преддверия,

шейки матки и труб, что сопровождается выделением слизи из половых органов.

Трансгенным называют животное, если в его геноме наблюдается экспрессия чДНК.

Трансгеноз – это метод, при котором осуществляют искусственный перенос гена из одной биологической системы в другую.

Транскрипционная единица – участок ДНК, с которой считывается РНК, берущая начало от промотора и заканчивающаяся на терминаторе.

Транскрипция – это синтез РНК на молекуле ДНК.

Трансляция – это перевод информации, заложенной в кодонах мРНК в аминокислотную последовательность полипептидной цепи.

Трансплантат – это животное, полученное методом трансплантации эмбрионов.

Трансплантация эмбрионов – это метод переноса эмбриона от самки-донора в самку - реципиент.

Трансплантация эмбрионов в животноводстве – это биотехнологический метод воспроизводства, позволяющий при суперовуляции получать максимальное число жизнеспособных эмбрионов от самок – доноров в целях пересадки их в генитальный аппарат реципиентов.

Третичная структура белка – это законченная трехмерная организация всех атомов полипептидной цепи.

тРНК – это посредник, обеспечивающий связь кодонов с аминокислотами.

Универсальный блок – это отдельная комната, которая смежно располагается с учебной аудиторией и в которой сосредоточены все оборудования и приборы, необходимые для проведения эмбриокультуральных исследований.

Уровень суперовуляции – это показатель, указывающий на число полученных дополнительных овуляций в одном половом цикле у гормонально обработанной самки-донора.

Физиологическая зрелость животного - это период физиологического созревания, когда организм приобретает формы, свойственные взрослому животному данного пола и достигает 70 -75% его живой массы.

Флотация сперматозоидов – это процедура, представляющая собой метод получения фракции, обогащенной подвижными сперматозоидами.

Фолликул – это соматическая клетка яичника, которые в комплексе обеспечивают развитие ооцита.

Фолликулярная фаза – фаза деятельности ФСГ гормона, который обеспечивает рост и развитие фолликулов.

ФСГ вызывает рост и созревание фолликулов в яичниках.

Химера – это животное, в состав которого входят бластомеры, происходящие более чем от одного эмбриона.

Хирургический метод трансплантации эмбрионов – это метод трансплантации эмбрионов, при котором осуществляется совокупность механических воздействий, приводящих к нарушению целостности ткани при осуществлении доступа к гениталиям самок животных.

Цитоплазма состоит из водянистого основного вещества - гиалоплазмы и находящихся в нем ядра, разнообразных органелл и включений.

Чашки Петри – это круглые плоскодонные чашки, используемые для сбора эмбрионов, фолликулов и сперматозоидов.

Четвертичная структура белка – это образование мультимерных белков при соединении нескольких полипептидных цепей.

Чужеродная ДНК – это фрагмент ДНК эукариот в составе рДНК, которая является структурным или регуляторным геном.

Экзогенный фактор – это внешний фактор, влияющий на признак.

Экзогормон – это гормоны, вводимые в организм животных извне.

Экспрессия – самовыражение гена, которая проявляется через транскрипцию и трансляцию.

Экстракорпоральное оплодотворение (ЭКО) – это процедура, обеспечивающая оплодотворение гамет в лабораторных условиях, т.е. вне организма животного.

Электрический сушильный шкаф – прибор, позволяющий сушить посуду горячим воздухом.

Эмбриоинженерия – это метод биотехнологии в животноводстве, направленный на изыскание путей и возможностей извлечения из животного организма генетического ресурса и основанный на применении методов молекулярной и клеточной биотехнологии с целью получения генетически "сконструированных" человеком и экономически рентабельных организмов.

Эмбриоинженерия – это наука, занимающаяся изменением генетической программы животных на уровне их гамет и эмбрионов.

Эмбриокультура – это метод биотехнологии в животноводстве, направленный на изыскание путей и возможностей извлечения физиологического ресурса из гамет и эмбрионов животных и основанный на сохранении у гамет и эмбрионов процессов жизнедеятельности и обеспечении им благоприятных условий развития *in vitro* и *in vivo*.

Эмбриотрансплантация – это метод биотехнологии в животноводстве, направленный на изыскание путей и возможностей извлечения физиологического ресурса из репродуктивной системы животных и основанный на применении метода трансплантации эмбрионов с целью ускоренного размножения ценных генотипов.

Эндогенный фактор – это внутренний фактор, влияющий на развитие признака и сосредоточенный в самом организме животного.

Эстроген – это гормон регулятор для ФСГ или ЛГ активности.

Яичники – это небольшие парные органы, выполняющие две функции – производят женские половые клетки (яйцеклетки) и секретируют женские половые гормоны (эстроген, прогестерон).

Яйцеклетка – это гаплоидная, крупная, недвижимая половая клетка самок животных, приспособленная для полового слияния с целью активации и дальнейшего эмбрионального развития.

ЛИТЕРАТУРА

1. Amemiya C. T., J. Games, P. M. Kroisel, H. Shizuya, C. Chen, M. A. Batzer, and P. J. de Jong. 1994. A new bacteriophage-derived vector for the propagation of large human DNA fragments. *Nat. Genet.* 6:84-89.
2. Anonymous. 1987. *New Developments in Biotechnology—Background Paper: Public Perceptions of Biotechnology.* Office of Technology Assessment, U.S. Congress, U.S. Government Printing Office.
3. Barton S C Adams C. A., Norris M. L., Surani M. A. H. (1985). *J. Embryol.*
4. Barton S. C., Surani M. A. H. (1983). *Exp. Cell Res.*, 146, 187.
5. Barton S. C., Surani M. A. H., Norris M. L. (1984). *Nature*, 311, 374.
6. Belmont J. W., Henkel-Tiggles J., Chang S. M. W., Wager-Smith K., Kellems R. E., Dick J. E., Magli M. C., Phillips R. A., Bernstein A., Caskey C. T. (1986). *Nature*, 322, 385.
7. Berger, S. L., and A. R. Kimmel (ed.). 1987. *Methods in Enzymology*, vol. 152. *Guide to Molecular Cloning Techniques.* Academic Press, London, United Kingdom.
8. Brinster R. L., Chen H. Y., Trumbauer M. E., Yagle M. K., Palmlter R D. (1985). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82, 4438.
9. Brinster R. L., Chen H. Y., Warren R., Sarthy A., Palmlter R. D. (1982) *Nature*, 296, 39.
10. Bud, R. 1993. *The Uses of Life: a History of Biotechnology.* Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom/
11. Davis, B. D. (ed.). 1991. *The Genetic Revolution: Scientific Prospects and Public Perceptions.* The Johns Hopkins University Press, Baltimore, Md.
12. Buratowski, S. 1994. The basics of basal transcription by RNA polymerase II. *Cell* 77:1-3.
13. Chada K., Magram L, Raphael K., Radice G., Lacy E., Costantini F. (1985) *Nature*, 314, 377.
14. Chapman V. M., Whitten W. K., Ruddle F. H. (1971). *Dev. Biol.*, 26, 153.
15. Chen, E. Y., and P. H. Seeburg. 1985. Supercoil sequencing: a fast and simple the cornmethod for sequencing plasmid DNA. *DNA* 4:165-170.
16. Chen, E. Y., and P. H. Seeburg. 1985. Supercoil sequencing: a fast and simple method for sequencing plasmid DNA. *DNA* 4:165-170.
17. Climie, S., and D. V. Santi. 1990. Chemical synthesis of the thymidylate synthase gene. *Prnt)c. Ntitl. Acad. Sci. USA* 87:633-637.
18. Climie, S., and D. V. Santi. 1990. Chemical synthesis of the thymidylate synthase gene. *USA* 87:633-637.
19. Covarrubias L, Nishida Y., Mintz B. (1986). *Proc. Natl. Acad. Sd. USA.* 83, 6020.

20. Cuthbertson K. S. R. (1983). *J. Exp. Zool.*, 226, 311.
21. Di Donato, A., M. de Nigris, N. Russo, S. Di Biase, and G. D'Alessio. 1993. A method for synthesizing genes and cDNAs by the polymerase chain reaction. *Anal.* 212:91-293.
22. Di Donato, A., M. de Nigris, N. Russo, S. Di Biase, and G. D'Alessio. 1993. A method for synthesizing genes and cDNAs by the polymerase chain reaction.
23. Erlich, H. A., D. Gelfand, and J. J. Sninsky. 1991. Recent advances in the polymerase chain reaction. *Science* 252:1643-1651.
24. Fahy G. M., MacFarlane D. R., Angell C. A., Meryman H. T. (1984). *Cryobiology*, 21, 407.
25. Feinberg A. P., Vogelstein B. (1984). *Anal. Biochem.*, 137, 266.
26. Fishwild, D. M., S. L. O'Donnell, T. Bengoechea, D. V. Hudson, F. Harding, S. L. Bernhard, D. Jones, R. M. Kay, K. M. Higgins, S. R. Schramm, and N. London.
27. Fodor, W. L., B. L. Williams, L. A. Matis, J. A. Madri, S. A. Rollins, J. W. Knight, W. Velander, and S. P. Squinto. 1994. Expression of a functional human complement inhibitor in a transgenic pig as a model for the prevention of xenogeneic hyperacute organ rejection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:11153-11157.
28. Fox, D. K., B. Westfall, M. Nathan, A. J. Hughes, Jr., A. Rashtchian, and D. M. 1996. Striding new distances with 5' RACE: long 5' RACE of human APC and TSC-2 CDNA. *Focus* 18:33-37.
29. Games, D., D. Adams, R. B. Alessandrini, R. Barbour, P. Berthelette, C. Blackwell, T. Carr, J. Clemens, T. Donaldson, F. Gillespie, T. Guido, S. Hagopian, K. Johnson-Wood, K. Khan, M. Lee, P. Leibowitz, I. Lieberburg, S. Little, E. Masliah, L. McConlogue, M. Montoya-Zavala, L. Mucke, L. Paganini, E. Penniman, M. Power, D. Schenk, P. Seubert, B. Snyder, F. Soriana, H. Tan, J. Vitale, S. Wadsworth, B. Wolozin, and J. Zhao. 1995. Alzheimer-type neuropathology in transgenic mice overexpressing V717F P-amyloid precursor protein. *Nature* 373:523-527.
30. Gardner R. L. (1978). In: *Methods in Mammalian Reproduction*. Daniel J. C. (ed.), Academic Press, New York, p. 137.
31. Garfin, D. E. 1995. Electrophoretic methods, p. 53-109. In J. A. Glasel and M. P. Deutscher (ed.), *Introduction to Biophysical Methods for Protein and Nucleic Acid Research*. Academic Press, San Diego, Calif.
32. Giles R. E., Ruddle R. H. (1973). *In Vitro*, 9, 103.
33. Gong, Z., and C. L. Hew. 1995. Transgenic fish in aquaculture and developmental biology. *Curr. Top. Dev. Biol.* 30:177-214.
34. Gridley T., Soriano P., Jaenisch R. (1987). *Trends Genet.*, 3, 162.
35. Grinstead, J., and P. M. Bennett (ed.). 1988. *Methods in Microbiology*, vol. 21. Plasmid Technology. Academic Press, London, United Kingdom.

36. Hales, M. H., Finer, C. G., Davis, K. M., Zsebo, and A. Jakobovits. 1997. Functional transplant of megabase human immunoglobulin loci recapitulates human antibody response in mice. *Nat. Genet.* 15:146-156.
37. Harris H., Catkins L F. (1965). *Nature*, 205, 640.
38. Hsiao, K., P. Chapman, S. Nilsen, C. Eckman, Y. Harigaya, S. Younkin, F. Yan and G. Cole. 1996. Correlative memory deficits, AP elevation, and amyloid plaques in transgenic mice. *Science* 274:99-102.
39. Hsiao, K., P. Chapman, S. Nilsen, C. Eckman, Y. Harigaya, S. Younkin, F. Yan and G. Cole. 1996. Correlative memory deficits, AP elevation, and amyloid plaques in transgenic mice. *Science* 274:99-102.
40. Humphries, M. M., D. Rancourt, G. J. Farrar, P. Kenna, M. Hazel, R. A. Bush, P. A. Sieving, D. M. Shells, N. McNally, P. Creighton, A. Erven, A. Boros, K. Gulya, M. R. Capecchi, and P. Humphries. 1997. Retinopathy induced in mice by targeted disruption of the rhodopsin gene. *Nat. Genet.* 15:216-219.
41. Itakura, K., J. J. Rossi, and R. B. Wallace. 1984. Synthesis and use of synthetic oligonucleotides. *Biochem.* 53:323-356.
42. Jaenisch R. (1976). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 73, 1260.
43. Jaenisch R., Jaehner D., Nobis P., Simon L, Loehler L, Harbers K-, Grot-kopp D. (1981). *Cell*, 24, 519.
44. Jenne, J., J.-H. Hyttinen, T. Peura, M. Tolvanen, L. Alhonen, R. Sinervirta, and M. Halmekytö. 1994. Transgenic bioreactors. *Int. J. Biochem.* 26:859-870.
45. Johnson M.H. (1981). *J. Cell Biol.*, 303; Gates A.H. (1991). In: *Methods in Mammalian Embryology*.
46. Johnson-Wood, K., M. Lee, R. Motter, K. Hu, G. Gordon, R. Barbour, K. Khan, M. Gordon, H. Tan, D. Games, I. Lieberburg, D. Schenk, P. Seubert, and L. McConlogue. 1997. Amyloid precursor protein processing and Aβ42 deposition in a transgenic mouse model of Alzheimer disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:1550-1555.
47. Joyner A., Keller G., Phillips R. A., Bernstein A. (1983). *Nature*, 305, 556.
48. Kaufman M. H. (1983). *Early Mammalian Development: Parthenogenetic Studies*. Cambridge University Press, Cambridge.
49. Kaufman M. H. (1978). In: *Methods in Mammalian Reproduction*. Daniel J. C. (ed.), Academic Press, New York, p. 21.
50. Kaufman M. H. (1982). *J. Embryol. Exp. Morphol.*, 71, 139.
51. Kirn, U.-J., B. W. Birren, T. Slepak, V. Mancino, C. Boysen, H.-L. Kang, M. I. Simon, and H. Shizuya. 1996. Construction and characterization of a human bacterial artificial chromosome library. *Genomics* 34:213-218.
52. Koenig M., Hoffman E P., Bertelson C. L, Monaco A. P., Teener C., Kun-ke L. M. (1987). *Cell*, 50, 509.

53. Kozak, M. 1991. Structural features in eukaryotic mRNAs that modulate the initiation of translation. *J. Biol. Chem.* 266:1986-1987.
54. Kozak, M. 1991. Structural features in eukaryotic mRNAs that modulate the initiation of translation; Lodish, H., D. Baltimore, A. Berk, S. L. Zipursky, P. Matsudaira, and J. Darnell. 1995. *Molecular Cell Biology*, 3rd ed. Scientific American Books, Inc., New York, N.Y.
55. Krimpenfort, P., A. Rademakers, W. Eyestone, A. van der Schans, S. van den Broek, P. Kooiman, E. Kootwijk, G. Platenburg, F. Pieper, R. Strijker, and H. de Boer. 1991. Generation of transgenic dairy cattle using «in vitro» embryo production. *Biotechnology* 9:844-847.
56. Kubiak LZ., Tarkowski A. K. (1985). *Exp. Cell Res.*, 157, 561.
57. Kuehn M., Bradley A., Robertson E., Evans M. (1987). *Nature*, 326, 295.
58. Land R.B., *Genetics variation in hormone system*, 1999.
59. Lathe R., Vilotte LL., Clark J. (1987). *Gene*, in press.
60. Leibo S. P., Mazur P. (1978). In: *Methods In Mammalian Reproduction*. Daniel J. C., Jr (ed.), Academic Press, New York, p. 179.
61. Leonardo, E. D., and J. M. Sedlvy. 1990. A new vector for cloning large eukaryotic DNA segments in *Escherichia coli*. *Bio/Technology* 8:841-844.
62. Lodish, H., D. Baltimore, A. Berk, S. L. Zipursky, P. Matsudaira, and J. Darnell. 1995. *Molecular Cell Biology*, 3rd ed. Scientific American Books, Inc., New York.
63. Maniatis T., Fritsch E. F., Sambrook J. (1982). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
64. Martin, C., L. Bresnick, R.-R. Juo, J. C. Voyta, and I. Bronstein. 1991. Improved chemiluminescent DNA sequencing. *Biotechniques* 11:110-114.
65. Masliah, E., A. Sisk, M. Mallory, L. Mucke, D. Schenk, and D. Games. 1996. Comparison of neurodegenerative pathology in transgenic mice overexpressing V717FP-amyloid precursor protein and Alzheimer's disease. *J. Neurosci.* 16:5795-5811.
66. McCurry, K. R., D. L. Kooyman, C. G. Alvarado, A. H. Cotterell, M. J. Martin, J. S. Logan, and J. L. Platt. 1995. Human complement regulatory proteins protect swine-to-primate cardiac xenografts from humoral injury. *Nat. Med.* 1:423-427.
67. McGrath J., Solter D. (1984). *Science*, 226, 1317.
68. McGrath J., Solter D. (1983). *Science*, 220, 1300.
69. Michiels F., Burmeister M., Lehrach H. (1987) *Science*, 236 1305.
70. Mullis, and H. A. Erlich. 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA. *Science* 239:487-491.
71. Mullis, K. B., F. Ferr6, and R. A. Gibbs (ed.). 1994. *The Polymerase Chain Reaction*.

72. Murby, M., M. Uhl6n, and S. StShl. 1996. Upstream strategies to minimize proteolytic degradation upon recombinant production in *Escherichia coli*. *Protein Expr. Purif.* 7:129-136.
73. Nagai, K., and H. C. Thogersen. 1984. Construction of P-globin by sequence-specific proteolysis of a hybrid protein produced in *Escherichia coli*. *Nature* 309:810-812.
74. Nakamura, Y., K. Ito, and L. A. Isaksson. 1996. Emerging understanding of translation termination. *Cell* 87:147-150.
75. Neff J. M., Enders J. F. (1968). *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 127, 260.
76. Nygren, P. A., S. StShl, and M. Uhl6n. 1994. Engineering proteins to facilitate bio. processing. *Biotechnol.* 12:184-188.
77. O'Neil, K. T., and R. H. Hoess. 1995. Phage display: protein engineering by directed evolution. *C r. Opin. Striict. Biol.* 5:443-449.
78. Old, R. W., and S. B. Primrose. 1985. *Principles of Gene Manipulation*, 3rd ed. Black-well Scientific Publications, Oxford, United Kingdom.
79. Oster-Granite, M. L., D. L. McPhie, J. Greenan, and R. L. Neve. 1996. Age-dependent neuronal and synaptic degeneration of mice transgenic for the C terminus of the amyloid precursor protein. *J. Neurosci.* 16:6732-6741.
80. Palmlter R. D., Brinster R. L. (1986). *Annu. Rev. Genet.*, 20, 465.
81. Panganiban A T. (1985). *Cell*, 42, 5.
82. Quinh P., Bands C., Whittingham'D. G. (1982). *J. Reprod. Pert.*, 66, 161.
83. R. Capecchi, and P. Humphries. 1997. Retinopathy induced in mice by targeted disruption of the rhodopsin gene. *Nat. Genet.* 15:216-219.
84. Rail W. F. (1986). *Cryobiology*, 23, 548.
85. Rail W. F., Reid D. S., Polge C. (1984) *Cryobiology*, 21, 106.
86. Relk W., Williams G., Barton S. C., Norris M. L., Neuberger M., Surani M. A. H. (1987). *Eur. J. Immunol.*, 17, 465.
87. Remaut, E., H. Tsao, and W. Fiers. 1983. Improved plasmid vectors with thermoinducible expression and temperature-regulated runaway regulation. *Gel* 22:103-113.
88. Robertson E., Bradley A., Kuehn M., Evans M. (1986). *Nature*, 323, 445.
89. Rogers, S., R. Wells, and M. Rechsteiner. 1986. Amino acid sequences common to rapidly degraded proteins: the PEST hypothesis. *Science* 234:364-368.
90. Ruth M. Gatenby, Sheep, Ned., 1991.
91. Saiki, R. K., D. H. Gelfand, S. Stoffel, S. Scharf, R. Higuchi, G. T. Horn, K. B.
92. Sambrook, J., E. F. Fritsch, and T. Maniatis. 1989. *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.

93. Sander, F. C., R. A. Fachini, D. E. Hughes, J. L. Galazzo, and J. E. Bailey. 1994. Expression of *Vitreoscilla* hemoglobin in *Corynebacterium glutamicum* increases final concentration and yield of L-lysine, P. 607-610. In L. Alberghina, L. Frontali, and P. Sensi (ed.), Proceedings of the 6th European Congress of Biotechnology. Elsevier Science B.V., Amsterdam, The Netherlands.
94. Sanes J. R., Rubenstein J. L. R., Nicolas J. F. (1986). *EMBO J.*, 5, 3133.
95. Sanger, F., S. Nicklen, and A. R. Coulson. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74:5463-5467.
96. Sassenfeld, H. M. 1990. Engineering proteins for purification. *Trends Biotechnol.* 8:88-93.
97. Scheffen B., Van Der Zwalm P., Massip A. (1986). *Cryo-Letters*, 7, 260.
98. Schoenherr, C. J., and D. J. Anderson. 1995. The neuron-restrictive silencer factor (NRSF): a coordinate repressor of multiple neuron-specific genes. *Science* 267:1360-1363.
99. Schuster, D. M., G. W. Buchman, and A. Rashtchian. 1992. A simple and efficient cDNA ends using 5' RACE. *Focus* 14:46-52.
100. Schuster, D. M., G. W. Buchman, and A. Rashtchian. 1992. A simple and efficient method for amplification of cDNA ends using 5' RACE. *Focus* 14:46-52.
101. Sealey P. G., Southern E. M. (1982). In: *Gel Electrophoresis of Nucleic Acids — A Practical Approach*. Rickwood D. and Hames B. D. (eds.), IRL Press, Oxford, p. 39.
102. Shimotohno K., Temin H. M. (1981). *Cell*, 26, 67.
103. Simmons, L. C., and D. G. Yansura. 1996. Translational level is a critical factor the secretion of heterologous proteins in *Escherichia coli*. *Nat. Biotechnol.* 14:629-6.
104. Slightom, J. L., R. F. Drong, and P. P. Chee. 1993. Construction of a clone banks, p. 121-146. In B. R. Glick and J. E. Thompson (ed.), *Methods in Plant Molecular Biology and Biotechnology*. CRC Press, Boca Raton, Fla.
105. Soriano P., Cone R., Mulligan R., Jaenisch R. (1986). *Science*, 234, 1409.
106. Southern, E. 1975. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by electrophoresis. *J. Mol. Biol.* 98:503-507.
107. Spindle A. (1981). *Exp. Cell Res.*, 131, 465.
108. Stewart C. L., Schuetze S., Vanek M., Wagner E. F. (1987). *EMBO J.*, 6, 383.
109. Sung, W. L., F. L. Yao, D. M. Zahab, and S. A. Narang. 1986. Short synthetic oligodeoxyribonucleotide leader sequences enhance accumu-

- lation of human pro. sulin synthesized in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83:561-565.
110. Surani M. A. H., Barton S. C. (1983). *Science*, 222, 1034. 18 Surani M A H., Barton S. C., Norris M. L. (1984). *Nature*, 308, 548. 19. Mann J. R., Lovell-Badge R. H. (1984). *Nature*, 310, 66.
111. Surani M. A. H., Barton S. C., Norris M. L. (1986). *Cell*, 45, 127.
112. Talmadge, K., and W. Gilbert. 1982. Cellular location affects protein stability in *E. coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79:1830-1833.
113. Tate, W. P., and C. M. Brown. 1992. Translational termination: «stop» for protein synthesis or «pause» for regulation of gene expression. *Biochemistry* 31:2443-2450.
114. Taylor, W. M., and P. J. Hagerman. 1987. A general method for cloning DNA frag. ments in multiple copies. *Gene* 53:139-144.
115. Tobias, J. W., T. E. Schrader, G. Rocap, and A. Varshavsky. 1991. The N-end in bacteria. *Science* 254:1374-1377.
116. Trounson A., Mohr L. (1983). *Nature*, 305, 707.
117. Tsuchiya, M., and Y. Morinaga. 1988. Genetic control systems of *Escherichia coli* CU confer inducible expression of cloned genes in coryneform bacteria. *Biotechnol.*, 6:428-430.
118. Washington, D.C; Bud, R. 1991. *Biotechnology in the twentieth century*. *Soc. Stud. Sci.* 21:415-457.
119. Whittingham D. G. (1977). .In: *The Freezing of Mammalian Embryos*. *Effie Foundation Symposium* 52, Elliott K. and Whelan J. (eds), Elsevier/North Holland, Amsterdam, p. 97.
120. Whittingham D. G. (1980). In: *Low Temperature Preservation in Medicine and Biology* Ashwood-Smith M. J., Farrant J. (eds), Pitman Medical, Tun-bridge Wells, UK p. 65.
121. Whittingham D. G., Wales R. G. (1969). *Aust. J. Biol. Sci.*, 22, 1065.
122. Whltlingham D. G. (1971). *J. Reprod Pert. (Suppl.)*, 14, 7.
123. Wiener G. *Animal Breeding*, 2001.
124. Wilcox, G., and G. M. Studnicka. 1988. Expression of foreign proteins in microor. ganisms. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 10:500-509.
125. Wilkinson, D. L., and R. G. Harrison. 1991. Predicting the solubility of recombinant proteins in *Escherichi coli*. *BiolTechnology* 9:443-448.
126. Willadsen S. M. (1986). *Nature*, 320, 63.
127. Williams, J. G. K., and A. A. Szalay. 1983. Stable integration of foreign DNA the chromosome of the cyanobacterium *Synechococc is R2*. *Gene* 24:37-51.
128. Wilmut I. (1986). In: *Manipulation of Mammalian Development*. Gwatkin R. B. L. (ed.), Plenum Press, New York.
129. Wilson P.R., *Biology of Reproduction*, 1999.
130. Winnacker, E.-L. 1987. *From Genes to Clones: Introduction to Gene Technology*. VCH, New York.
131. Zimmermann V., Vienken J. (1982). *J. Membr. Biol.*, 67, 165.

132. Бегимкулов Б.К. Генетика, Алматы, 2000.
133. Бегимкулов Б.К. Молекулярная генетика с основами биотехнологии, Алматы, 1996.
134. Белоус А.М., Криоконсервация репродуктивных клеток, Москва, 1986.
135. Бернет Ф. Клеточная иммунология: Пер с англ. – М.: Мир, 1971.
136. Гордон Дж. Регуляция функции генов в развитии животных: Пер. С англ. – М.: Мир, 1977.
137. Георгиевский В.И., Физиология сельскохозяйственных животных, 1990.
138. Глик Б., Пастернак Дж. Молекулярная биотехнология. Принципы применения. Москва, Изд. Мир, 2002.
139. Грин Н., Биология, Москва, 1990, т.3.
140. Де Робертис Э., Новинский В., Саэс Ф. Биология клетки: Пер. С англ. – М.: Мир, 1973.
141. Джамалова Г.А. и др. Биотехнология воспроизводства животных с основами эмбриоинженерии, А., 1996.
142. Завертяев Б.П., Биотехнология в воспроизводстве и селекции крупного рогатого скота, 1989.
143. Зенгбуш П. Молекулярная и клеточная биология в 3 т.: Пер. с нем. –М.: Мир, 1982.
144. Калашник И.А., Практикум по общей ветеринарной хирургии, Москва, 1982.
145. Каппучинелли П. Подвижность живых клеток: Пер. с англ. – М.: Мир, 1982.
146. Ким Г.Л. Практикум по селекции и разведению животных, Алматы, 2000.
147. Ким Г.Л. Практикум по животноводству, 2003.
148. Красота В.Ф. и др. Разведение сельскохозяйственных животных, Москва, 1990.
149. Курбатова Д.А., Криоконсервация спермы сельскохозяйственных животных, Москва, 1988.
150. Лакин Г.Ф., Москва, 1990.
151. Льюин Б., Москва, 1987 г. Гены, 1-3т.
152. Магда И.И, Оперативная хирургия, Москва, 1990.
153. Меркурьева Е.К., Биометрия, Москва, 1970.
154. Мингазова Т.А., Воспроизведение сельскохозяйственных животных, Москва, 1988.
155. Мурзамадиев А.М., Ертаев Е.Е., Салыкбаев Т.Н., Биотехнология в воспроизводстве овец, Алматы, 1992.
156. Петухов В.Л. и др. Генетические основы селекции животных, Москва, 1989.
157. Свенсон К., Уэбстер П. Клетка: Пер.с англ. – М.: Мир, 1990.

158. Станек И., Эмбриология человека, М., Веда, 1977.
159. Карлсон Б.М. Основы эмбриологии по Пэттену в 2 т.: Пер. с англ. – М.: Мир, 1983.
160. Студенцов А.П., 1980; В.С.Шипилов, Ветеринарное акушерство и гинекология, Москва, 1988.
161. Хантер Р.Х.Ф., Физиология и воспроизводство домашних животных, 1984.
162. Шипилов В.С. и др., Практикум по акушерству, гинекологии и искусственному осеменению, Москва, 1988.
163. Эрнст Л.К., Трансплантация эмбрионов сельскохозяйственных животных, 1989.
164. Эрнст Л.К. и др. Племенное дело в животноводстве, Москва, 1987.

ДЖАМАЛОВА ГУЛЯ АБАЕВНА

БИОТЕХНОЛОГИЯ ЖИВОТНЫХ

Гл. редактор Э.Кульбаев

Редактор Ю.Шишватова

Компьютерная верстка Д.Бакбергенов

Подписано в печать 26.03.04. Формат 60x84 1/16. Бумага офсетная. Гарнитура Прагматика. Печать офсетная. Уч. изд. л. 22,42. Тираж 1200 экз.

Агентство «Маматай» Алматы, ул. Фурманова, 220.

Отпечатано в типографии «High Technology» Алматы, ул. Мынбаева, 43.