

компактності розміщення ооцитів на 1 мм².

CULTIVATION CONDITIONS IMPACT ON THE CATTLE EMBRYOS IN-VITRO YIELD

A.I.Gandja, L.L.Letkevitch, V.P.Simonenko

The institute of animal science. NAS. Byelorussia

Oocyte fertilization and splitting embryos output were subject to the spell of mutual oocyte cultivation with semen's, the capacity and type of the agent ant density of oocytes on mm².

УДК 636.32/.38:591.3:57.089.38

**ВПЛИВ ФІДЕРНИХ КЛІТИН ЯЙЦЕПРОВОДІВ НА
ДОЗРІВАННЯ ЕМБРІОНІВ ОВЕЦЬ ДО
ТРАНСФЕРАБЕЛЬНИХ СТАДІЙ**

**І.І. Гевкан, О.В. Штапенко, А.В. Мадіч, Ю.І. Сливчук, І.І. Розгоні,
С.В. Федорова**

Інститут біології тварин УААН

Проведено дослідження з удосконалення технологій запліднення in vitro ооцитів овець використовуючи фідерні клітини яйцепроводів корів з метою подолання блоку дроблення ембріонів овець, підвищення інтенсивності дроблення бластомерів та розвитку ембріонів до трансферабельних стадій. Досліджували вплив кріоконсервації ОКК методом вітрифікації на дозрівання і запліднення in vitro.

**вівці, фідерні клітини, ооцити, ембріони, капацитація сперми,
запліднення**

Відновлення поголів'я овець є перспективним і економічно вигідним завданням, яке можливе за умов реалізації комплексу організаційно-господарських заходів направлених на збільшення виробництва м'яса, що можливо завдяки впровадженню у практику передових наукових технологій.

Створення нових генотипів м'ясо-вовнової породи овець, які відповідали б вимогам інтенсивного виробництва високоякісної баранини, можливе із використанням методів репродуктивної біотехнології, до яких відносяться *in vitro* запліднення дозрілих ооцитів, створення банку сперми м'ясних порід овець, кріоконсервованих ооцитів та ембріонів і хірургічна трансплантація ембріонів овець, отриманих *in vitro*. Подальший розвиток методів репродуктивної біотехнології спрямований на розробку технологій запліднення дозрілих, лапароскопічно одержаних, ооцитів фракціонованою спермою, їх кріоконсервацію і трансплантацію, що може суттєво підвищити темпи розвитку цієї галузі тваринництва завдяки наведеному одержанню баранів-плідників м'ясо-вовнового типу.

Видова специфічність ооцитів овець сприяє результативному створенню клітинних ядерно-цитоплазматичних гібридів, їх розвитку у синтетичних середовищах, приживленню в організмі реципієнта та народженню життєздатних тварин, по розвитку яких можна судити про доцільність тих

чи інших генетичних комбінацій при створенні нових генотипів. У зв'язку з цим дослідження розвитку ооцитів *in vitro* овець, їх запліднення та розвиток до трансферабельних стадій з метою вдосконалення цієї технології є актуальним.

Умови дозрівання ооцит-кумулюсних комплексів овець, одержаних лапароскопічно, суттєво відрізняються від умов дозрівання *in vivo*. Сучасна ембріобіотехнологія вирішує питання одержання дозрілих і запліднених *in vitro* ооцитів корів завдяки співкультивуванню їх з клітинами гранульози фолікулів, слизової оболонки яйцепроводів та маткового фібробласту [2, 4].

Культура епітеліальних клітин яйцепроводів має найбільш оптимізуючий вплив на якість ооцитів при їх дозріванні *in vitro* завдяки вмісту у кондиційному середовищі фідерних клітин факторів росту, які стимулюють проліферативні процеси в клітинах кумулюсу ОКК, прискорюють метаболічні процеси в ооцитах, забезпечують цитоплазматичне та ядерне дозрівання ооцитів [1, 3], а в ембріонах викликають регенерацію ембріонального дроблення [6-7].

У проведених дослідах відсутність забою тварин унеможливила одержання культури фідерних клітин овець і виходячи зі спільної природи ембріонально-маткових факторів у жуйних для створення підтримуючого клітинного оточення в умовах *in vitro* були використанні яйцепроводи корів.

Відсутність та недостатнє забезпечення специфічними білками і факторами росту матки – одна з причин порушення мітотичного дроблення бластомерів і затримки подальшого розвитку ембріонів [5, 8], тому культивування ембріонів овець на моношарі фідерних клітин корів дасть змогу отримати якісні ембріони трансферабельних стадій.

Мета досліджень. Удосконалити метод запліднення *in vitro* одержаних лапароскопічно, дозрілих поза організмом, нативних та розморожених ооцитів овець шляхом спільного культивування з фідерними клітинами корів.

Методика досліджень. Дослідження проводили в рамках спільного міжнародного наукового проекту відповідно до угоди про співпрацю між Інститутом біології тварин УААН і Краківською аграрною академією ім.Х.Коллонтая та програми спільних наукових досліджень “Вивчити ефективність використання спеціалізованих м’ясних та багатоплідних порід для створення конкурентноздатного вівчарства в умовах західного регіону України” у навчальному господарстві “Комарнівський” Львівської національної академії ветеринарної медицини, спрямованих на створення стада овець м’ясо-вовнового типу продуктивності.

Для одержання культури фідерних клітин на Винниківському м’ясокомбінаті від клінічно здорових корів після забою відбирали яйцепроводи. Проби тканин транспортували на льоду у термосі при $t=-4^{\circ}\text{C}$ у фізрозчині з антибіотиком гентаміцином (100 од/мл).

Одержання культури ізольованих епітеліальних клітин яйцепроводу проводили згідно з методикою J.Kuzen, R.Rite (1978), що полягає у послі-

довній триразовій обробці зразків гомогенізованих тканин 1%-им розчином трипсину з наступним центрифугуванням отриманих клітин протягом 10 хвилин при 1000 об/хв. З метою відокремлення пошкоджених нежиттєздатних клітин проводили дворазове ресуспендування клітинної маси у культуральному середовищі з наступним центрифугуванням протягом 10 хв. при 1000 об/хв. Підрахунок клітин проводили у камері Горяєва. У стерильні чашки з культуральним середовищем ($V=200$ мкл) вводили ізольовані клітини яйцепроводів і культивували протягом 24 год. при $t=38,5^{\circ}\text{C}$, в атмосфері з 5 % CO_2 . Використовували первинну культуру клітин яйцепроводів у концентрації 1×10^6 клітин/мл середовища.

Дозрівання ооцитів овець на фідерному моношарі. Від 5 овець породи прекокс після гормональної обробки прогестероновими губками лапароскопічно аспірували 15 ооцитів: 11 з багатошаровим кумулюсом та 4 ооцити із залишками одношарового кумулюсу. Одержані ооцити були розділені на 2 групи – 13 ОКК дозрівали *in vitro* до метафази II протягом 24-х годин і потім запліднювали, а 2 ОКК заморожували і розморожували методом вітрифікації, після чого також дозрівали і запліднювали *in vitro*. Ооцити обох дослідних груп ставили на дозрівання в основному середовищі ДМЕМ+0,4% БСА при $38,5^{\circ}\text{C}$ упродовж 24 годин.

Для запліднення *in vitro* ооцитів овець використовували заморожену сперму баранів польської селекції породи саффолк із спермосховища лабораторії біології відтворення ІБТ УААН. Для цього провели капацитацію сперми методом, розробленим нами у попередніх дослідженнях, який полягає у двократному відмиванні сперми TALP та розділенні її на 4 флотаційні об'єми.

Після визначання концентрації спермій під мікроскопом проводили запліднення ооцитів *in vitro* у модифікованому середовищі (Fert-TALP) з 20% естральної сироватки, піруватом натрію, гепарином, гентаміцином з додаванням 20% кофеїну. Через 18 годин співкультивування презумптивні зиготи відмивали від сперми і переносили на моношар фідерних клітин для культивування упродовж 24 годин та морфологічно оцінювали.

Двом вівцематкам-реципієнтам була проведена хірургічна трансплантація ембріонів методом мікробужування в обидва роги матки на 3-ю добу після запліднення ооцитів *in vitro*.

Результати досліджень. Індукцію поліовуляції вівцематок проводили в анестральний період за допомогою гормонального препарату «Сєрогонадотропін» (Польща). Перед тим стимуляцію статевого циклу здійснювали за загальноприйнятою європейською схемою з використанням вагінальних губок з прогестероном «Хроногест» (Голандія).

Для прижиттєвого одержання ооцитів від 4 вівцематок лапароскопічно аспіровано 15 морфологічно якісних ооцит-кумулюсних комплексів.

Після дозрівання поза організмом одну групу ооцитів (n=13) запліднили капацитованою спермою барана породи саффолк (рис.1).

Іншу групу ооцитів (n=2) заморозили надшвидким методом і після 2-годинної витримки у рідкому азоті розморозили і також запліднили *in vitro* (таблиця).

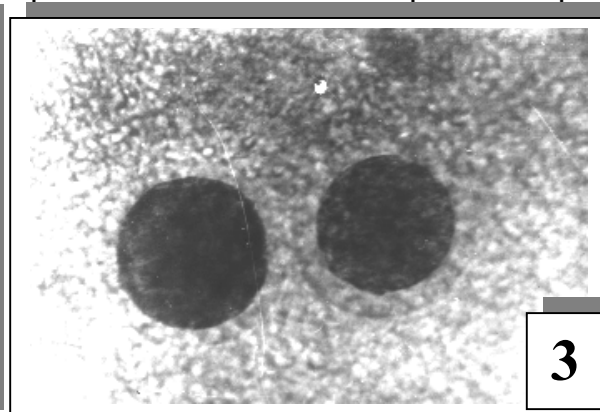
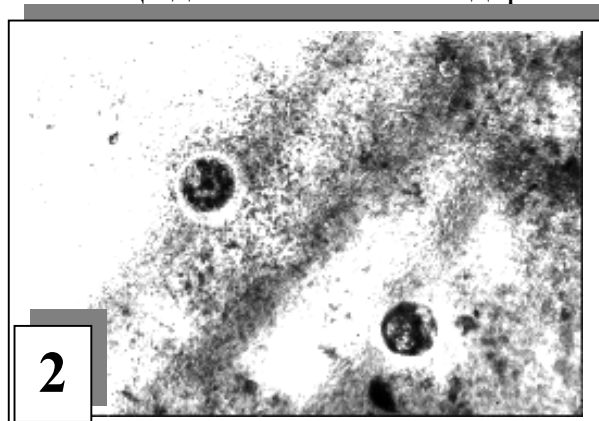


Групи	Кількість ооцитів, n-%	Дозрілих <i>in vitro</i> ооцитів протягом 24-х годин, n-%	Пенетрованих сперміями протягом 18 годин *, n-%	Розпочали дроблення <i>in vitro</i> протягом 48 годин *, n-%
Одержано ооцитів	15			
Нативні ооцити	13 - 87	12 - 92	11 - 91	8 - 72
Заморожені ооцити	2 - 13	2 - 100	2 - 100	1 - 50

Примітка: * - відсоток від ОКК дозрілих *in vitro*.

З метою підвищення рівня дроблення презумптивних зигот овець, їх культивували на моношарі епітеліальних клітин яйцепроводів корів (фідерних клітин), які попередньо одержували з забійного матеріалу і культивували 2 доби з додаванням гормонів і ростових факторів (рис.2-3).

Це дало можливість одержати 6 ранніх 4-8-ми бластомерних ембріонів



нів овець і 1 дво-бластомерний ембріон, який розвинувся з розмороженого ооцита, а також 2 зиготи. 7 ранніх ембріонів та 2 зиготи хірургічно трансплантували 2 вівцематкам-реципієнтам: одній - 2 ембріони і 2 зиготи, другій –5 ембріонів.

Хірургічна трансплантація ранніх ембріонів 2 вівцематкам-реципієнтам була проведена методом мікробужування в обидва роги матки на 3-й день після запліднення ооцитів *in vitro* (рис.4).



У результаті хірургічної трансплантації 7-ми ранніх ембріонів народилось двоє ягнят, по одному у кожній з двох вівцематок-реципієнтів.

У ході досліджень одержано тварини нових генотипів з м'ясним напрямком продуктивності та багатоплідністю для наступних етапів генетико-селекційних робіт. Напрацьовано цінний експери-

ментальний матеріал для подальшої розробки і удосконалення технології *in vitro* запліднення у жуйних тварин.

Висновки. Культивування презумптивних, отриманих поза організмом зигот на моношарі фідерних клітин збільшує інтенсивність дроблення ембріонів *in vitro*. Культуру фідерних клітин корів можна використовувати для культивування на них зигот і ембріонів овець з метою дозрівання їх до трансферабельних стадій.

Бібліографічний список

1. O'Brien J.K., Catt S.L., Ireland K.A., Maxwell M.C. and Evans G. In vitro and in vivo developmental capacity of oocytes from prepubertal and adult sheep // *Theriogenology*. – 1996. – Vol. 41. – N.1. – P. 1433-1443.
2. Derrar N., Price S., Sirard N. Effect of growth factors and co-culture with ovarian medulla on the activation of primordial follicles in explants of bovine ovarian cortex. // *Theriogenology*. – 2000. – Vol. 54. – N.4. – P.587-598.
3. Guler A., Poulin N., Mermillod P. Effect of growth factors EGF and IGF-I and estradiol on in vitro maturation of sheep oocytes // *Theriogenology*. – 2000. – Vol. 54. – N. 2. – P. 209-218.
4. Kazuchika Miyoshi, S. Jacek Rzucidlo, John R. Gibbons, Sezen Arat, Steven L. Stice Development of porcine embryos reconstituted with somatic cells and enucleated metaphase I and II oocytes matured in a protein-free medium // *Developmental biology*. – 2001. – Vol. 1. N. 12. – P. 1471-1481.
5. Lackey B., Gray D., Henricks N. Physiological basis for use on IGFs in reproductive application: A Review. // *Theriogenology*. – 2000. – Vol. 53. – N. 5. – P. 1147-1156.
6. Palma G.A., Brem G. Effect of growth factors IGF-I, TGF- α , EGF and PDGF on development of in vitro produced bovine blastocysts. // *Theriogenology*. – 1995. – Vol. 43. – N. 1. – P.291-305.
7. Sirisatein S., Hernandez-Fonseca H. Influence of epidermal growth factor and insulin on bovine blastocysts development in vitro. // *Animal reproduction science*. – 2003. – Vol. 77. – N.1-2. – P. 21-32.
8. Yang P., Roy S. Epidermal growth factor modulates transforming growth factor receptor messenger RNA and protein levels in hamster prenatal follicles in vitro. // *Biology of Reproduction*. – 2001. – Vol. 65. – P. 847-854.

**ВЛИЯНИЕ ФИДЕРНЫХ КЛЕТОК ЯЙЦЕВОДОВ НА СОЗРЕВАНИЕ ЭМБРИОНОВ
ОВЕЦ ДО ТРАНСФЕРАБЕЛЬНЫХ СТАДИЙ**

И.И. Гевкан, О.В. Штапенко, А.В. Мадич, Ю.И. Сливчук, И.И. Розгони, С.В. Федорова
Институт биологии животных УААН

Проведены исследования по усовершенствованию технологий оплодотворения in vitro ооцитов овец, используя фидерные клетки яйцеводов коров, с целью преодоления блока дробления эмбрионов овец, повышения интенсивности дробления бластомеров и развития эмбрионов до трансферабельных стадий. Исследовали влияние криоконсервации ОКК методом витрификации на созревание и оплодотворение in vitro.

**THE OVIDUCT FEEDER CELLS IMPACT ON THE SHEEP EMBRYOS MATURATION TO
THE ET STAGES**

I.I.Gevkan, O.V.Shtapenko, A.V.Madich, U.I.Slivchuk,
I.I.Rozgoni, S.V.Fedorova

The institute of animals biology UAAS

The researches of sheep oocytes in vitro fertilization technologies perfection via the cow's oviduct feeder cells utilization were fulfilled. These investigations were aimed at sheep embryos crushing block suppression, blastomeres grinding intensity boost and the maturation of embryos to the ET stages. OCC (oocytes cumulous complexes) cryo-preservation impact on fertilization and maturation via vitrification technique was investigated.

УДК 636.082.12

**ПРОБЛЕМИ СИСТЕМАТИЗАЦІЇ НАУКОВОГО
СУПРОВОДУ БІОТЕХНОЛОГІЧНИХ ПРОЦЕСІВ ПРИ
РОЗВЕДЕННІ ТВАРИН МОЛОЧНИХ ПОРІД**

А.Д. Гєскієв *

дослідне господарство ІТЦР УААН «Червоний Шахтар»

Зростання впливу інтенсивних біотехнологій відтворення молочних порід великої рогатої худоби потребує розробки сучасних наукових систем визначення ролі біотехнологічних важелів. Запропоновано технологічний проект для здійснення такої класифікації та визначено переважний рівень внеску батьківських структур у регіональних мікропопуляціях червоної степової породи та імпортованих чорно-рябих голишинів.

**відтворення популяції, біотехнологічна класифікація, внесок
предкових структур**

Тенденція на збільшення біотехнологічної інтенсифікації, використання спеціалізованих генотипів буде продовжуватись і в майбутньому, тому що при комплексному застосуванні вона діє узгоджено з певним рівнем сприятливих умов середовища і є економічно виправданою.

Якщо сьогодні в економічно розвинених країнах від одного бугая-плідника одержують до 100 тисяч і більше нащадків, то в наступні роки інтенсивність розмноження окремих генотипів буде значно збільшена за

* Науковий консультант – доктор с.-г. наук, професор, академік УААН В.С. Козир